Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estudios sobre la ciclotetramerización enzimática del porfobilinógeno : Su mecanismo

Rossetti, María Victoria

1978

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:
Rossetti, María Victoria. (1978). Estudios sobre la ciclotetramerización enzimática del porfobilinógeno : Su mecanismo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1569_Rossetti.pdf

Cita tipo Chicago:
Rossetti, María Victoria. "Estudios sobre la ciclotetramerización enzimática del porfobilinógeno : Su mecanismo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1978. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1569_Rossetti.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

ESTUDIOS SOBRE LA CICLOTETRAMERIZACION ENZIMATICA DEL PORFOBILINOGENO
Su Mecanismo

POR

MARIA VICTORIA ROSSETTI

Tesis Presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

de la UNIVERSIDAD de BUENOS AIRES

Director: Dra. Alcira N. del C. Batlle de Albertoni

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Universidad de Buenos Aires

BUENOS AIRES, Diciembre de 1978

TOMO 1

ESTUDIOS SOBRE LA CICLOTETRAMERIZACION ENZIMATICA DEL PORFOBILINOGENO - SU MECANISMO

por

María Victoria Rossetti

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

DE LA UNIVERSIDAD

DE

BUENOS AIRES

Director: Dra. Alcira M. del C. Batlle de Albertoni

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales -
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Universidad de Buenos Aires

BUENOS AIRES, Diciembre de 1978

a MIS PADRES

a Ana Adela

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi sincero agradecimiento a la Dra. A.M.del C.Batlle de Albertoni, quien me dirigió y orientó en la realización de este trabajo, por su permanente interés y dedicación.

Hago extenso dicho agradecimiento a todos mis compañeros, integrantes del Centro de Investigación de Porfirinas y Porfirias (CIPYP); especialmente a las Dras. Wider de Xifra y Stella de Rosellini, y a la Lic. Juknat de Geralnik, quienes con su colaboración y constante apoyo moral, permitieron la conclusión de esta tesis.

Enfatizo mi profundo agradecimiento a la Lic. Juknat de Geralnik por su eficaz y siempre dispuesta cooperación en la realización de varias de las experiencias que posibilitaron la finalización del presente trabajo.

Deseo destacar también, la excelente asistencia técnica prestada por la Srta. Hilda Gasparoli y la siempre buena disposición encontrada en el Sr. Ortega, integrantes del CIPYP.

Al CONICET por las becas otorgadas, como así también a éste y al SECYT por los subsidios concedidos a la Dra. Batlle, con los cuales se ha financiado este trabajo.

Finalmente, a todos aquellos que no he mencionado pero que, en una u otra forma, hicieron posible su presentación.

SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

Suc.CoA	Succinil coenzima A
Gli	Glicina
ALA	Acido delta aminolevúlico
PBG	Porfobilinógeno
Uro, Urogen	Uroporfirina, Uroporfirinógeno
Firia, Firiagen	Firiaporfirina, Firiaporfirinógeno
Copro, Coprogen	Coproporfirina, Coproporfirinógeno
Proto, Protogen	Protoporfirina, Protoporfirinógeno
PCE	Porfíria congénita eritropoiética
PC	Protoporfiria eritropoiética
PAI	Porfiria aguda intermitente
PV	Porfiria variegata
PCT	Porfiria cutánea tarda
Suc. Co-S	Succinil CoA sintetasa
ALA-S	ALA sintetasa
ALA-D	ALA dehidrasa
PBGasa	Porfobilinogenasa
Dcasa	Decarboxilasa
CPGasa	Coprogenasa
PTGasa	Protogen-oxidasa
CiSH	Cisteína
EDTA	Acido etilen diamino tetra acético
PDMAB	p-dimetil amino benzaldehido
PPi	Fosfato de piridoxal
Pi	Acido fosfórico
TCA	Acido tricloro acético

Seph	Sephadex
Tris	Tri (hidroximetil)-aminometano
PM	Peso molecular

OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Mediante el empleo de un organismo con las características tan peculiares de la Euglena gracilis, que puede comportarse como un 'animal' ó una planta se propuso:

1) Estudiar la biosíntesis de porfirinas a partir del precursor PBG, determinando las condiciones óptimas para el cultivo del organismo, extracción de los sistemas enzimáticos, influencias diversas sobre contenido proteico, de clorofila, y de actividad, como condiciones de iluminación durante el desarrollo, temperatura, tiempo de crecimiento; por otro lado, establecimiento de otras variables, como temperatura, atmósfera y tiempo de incubación, pH óptimo, curvas de saturación de sustrato, constantes cinéticas. Estudios comparativos con polvos cetónicos. Efecto de sales y otros agregados. Relaciones de actividad en diferentes fracciones enzimáticas. Distribución celular.

2) El aislamiento y purificación de la PBGasa, Deaminasa e Isomerasa a partir de diferentes materiales de partida. La determinación de sus Pesos Moleculares con el objeto de aclarar el interrogante que todavía existía acerca del tipo de asociación y relación molecular entre ambos componentes.

3) La búsqueda de intermediarios polipirrólicos naturales en distintas condiciones y a partir de diferentes sistemas enzimáticos, PBGasa y Deaminasa. Utilización enzimática de los intermediarios libres y unidos a las enzimas . Naturaleza y significado de su interacción con las enzimas. Estudio de la estructura de esos intermediarios, propiedades. Síntesis química de porfirinas a partir de los intermediarios, cinética de la reacción de condensación no enzimática y efecto del pH sobre la misma.

4) Investigar acerca de la existencia de algún factor regulatorio de la síntesis enzimática de porfirinógenos, su acción sobre la actividad de

las enzimas solubles y de membrana, propiedades, función, naturaleza y mecanismo.

5) Con el aporte de los resultados obtenidos de estos estudios, y las evidencias experimentales ya existentes, hacer un análisis exhaustivo de la situación y proponer un esquema actualizado para el mecanismo de acción de la ciclotetramerización enzimática del PBG en Uroporfirinógenos.

CONTENIDO

		Hoja
AGRADECIMIENTOS		i
SIMBOLOS Y ABREVIATURAS		ii
OBJETIVOS		iv
INDICE		vi
INTRODUCCION		
A - TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS		
I	INTRODUCCION	1
II.	HISTORIA	3
III.	TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS	6
III.1.	NOMENCLATURA Y ESTRUCTURA	6
	III.1.1. Porfirinas	7
	III.1.2. Porfirinógenos	7
	III.1.3. Metaloporfirinas	8
	III.1.4. Hemoproteinas	8
	III.1.5. Clorofilas	9
	III.1.6. Tetrapirroles de cadena abierta	9
III.2.	PROPIEDADES FISICAS	10
	III.2.1. Solubilidad	10
	III.2.2. Espectros	11
	III.2.3. Fluorescencia	12
IV.	BIOSINTESIS de los tetrapirroles	13
IV.1.	INTRODUCCION	13
IV.2.	ORIGEN DE LOS ATOMOS DE CARBONO Y NITROGENO DE LOS TETRAPIRROLES NATURALES	14
IV.3.	EL PBG. INTERMEDIARIO EN LA BIOSINTESIS	14
IV.4.	ALA - PRECURSOR DEL PBG.	15
V.	ENZIMAS DEL CAMINO DE LOS TETRAPIRROLES	16
V.1.	SUCCINIL COA-SINTETASA	16
	V.1.1. Propiedades y Mecanismo	16
V.2.	ACIDO -AMINO LEVULICO SINTETASA	17
	V.2.1. Propiedades y Mecanismo	17
	V.2.2. Rol del ALA-S en el camino metabólico de las porfirinas	18

V.3.	ACIDO -AMINO LEVULICO DEHIDRASA		19
	V.3.1.	Propiedades y Mecanismo	19
	V.3.2.	Rol del ALA-D en el metabolismo de la las porfirinas	20
V.4.	PORFOBILINOGENASA		21
	V.4.1.	Introducción	21
	V.4.2.	Propiedades Generales de las Enzimas	22
	V.4.3.	Estudios Cinéticos	29
	V.4.4.	Intermediarios Polipirrólicos	32
	V.4.5.	Evidencias Adicionales de Interés	41
	V.4.6.	Rol de la PBG-asa en el camino metabólico de las porfirinas	44
V.5.	DECARBOXILASA		51
	V.5.1.	Propiedades y Mecanismo	51
	V.5.2.	Rol de la Decarboxilasa en el camino de las porfirinas	52
V .6.	COPROPORFIRINOGENASA		52
	V.6.1.	Propiedades y Mecanismo	52
	V.6.2.	Rol de la CPG-asa en el camino de las porfirinas	54
V .7.	PROTOPORFIRINOGENO OXIDASA		54
	V.7.1.	Propiedades	54
	V.7.2.	Rol de la Protogen Oxidasa en el camino de las porfirinas	55
V .8.	FERROQUELATASA		55
	V.8.1.	Propiedades	55
	V.8.2.	Rol de la Ferroquelatasa en el camino de las porfirinas	55
V I.	REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS		56
V I.1.	MANIFESTACIONES DE LOS MECANISMOS DE REGULACION		56
V I.2.	MECANISMOS DE CONTROL		57
	VI.2.1.	Control por retro-inhibición y por represión enzimática del ALA-S	57
	VI.2.2.	Control por cambios en la actividad del ALA-S	58
	VI.2.3.	Control por cambios en la cantidad de ALA-S	58
	V.2.4.	Control por localización tisular y celular	60

VI.2.5. Compartimentalización intracelular 60
VI.2.6. Control por otros constituyentes del r dio ambiente ó celular 61
VI.2.6.1. Oxígeno 61
VI.2.6.2. Iluminación 61
VI.2.6.3. ATP 61
VI.2.7. Control por interconexión con otros caminos metabólicos 62

B3 - EUGLENA

II. SU IMPORTANTE ROL EN LA INVESTIGACION 63
III. MORFOLOGIA 68
III.1. TAMAÑO 68
III.2. FORMA 68
III.3. COLOR 68
III.4. FLAGELOS 68
III.5. COMPLEJO PELICULAR 69
III.6. STIGMA y CUERPO PARAFLAGELAR 70
III.6.1. Stigma 70
III.6.2. Cuerpo paraflagelar 72
III.7. CANAL Y RESERVORIO 72
III.8. MITOCONDRIAS 73
III.9. APARATO DE GOLGI 74
III.10. RETICULO ENDOPLASMATICO Y RIBOSOMAS 75
III.11. CLOROPLASTOS Y PIRENOIDES 76
III.12. RIZOPLASTO 76
III.13. PARAMILON 76
III.14 CUERPOS DE MUCUS 77
III.15. QUISTES 77
III.16. NUCLEO 78
IV. CULTIVO Y CRECIMIENTO 79
IV.1. INTRODUCCION 79
IV.2. TECNICAS DE CULTIVO 79
IV.2.1. Sincronización por luz 80
IV.2.2. Sincronización por temperatura 80

III.3.	COMPOSICION QUIMICA BASICA	81
III.4.	REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO DE EUGLENA	82.
	III.4.1. Inorgánicos	82
	III.4.2. Vitamínicos	92
	III.4.3. Fuente exógena de carbono	97
III.5.	INFLUENCIA DE EUGLENA SOBRE EL MEDIO AMBIENTE	97
	III.5.1. Cambios en el pH	97
	III.5.2. Agotamiento de nutrientes	97
III.6.	EFECTOS DEL MEDIO AMBIENTE SOBRE EUGLENA	98
	III.6.1. pH inicial del medio de cultivo	98
	III.6.2. Fuente exógena de carbono	98
	III.6.3. Efectos de la luz	101
	III.6.4. Efectos de la temperatura	103
IV.	ENZIMOLOGIA DE LA EUGLENA	105
IV.1.	INTRODUCCION	105
IV.2.	ENZIMAS DEL METABOLISMO RESPIRATORIO	105
IV.3.	ENZIMAS Y COMPONENTES DE LA FOTOSINTESIS	108
IV.4.	ENZIMAS DEL METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS Y ACIDOS NUCLEICOS	114
IV.5.	ENZIMAS DEL METABOLISMO LIPIDICO	115
IV.6.	ENZIMAS DEL METABOLISMO DE AMINOACIDOS Y PROTEINAS	116
IV.7.	FOSFATASAS	117
IV.8.	ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES ENZIMATICOS CELULARES EN EUGLENA AUTOTROFICA y HETEROTROFICA	118
IV.9.	VARIACION DE LAS ACTIVIDADES EN RESPUESTA A CAMBIOS FISIOLOGICOS Y DEL MEDIO AMBIENTE	120
IV.10.	DISTRIBUCION ENZIMATICA INTRACELULAR	127
V.	COMPOSICION Y METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS EN EUGLENA	128
V.1.	COMPOSICION	128
V.2.	METABOLISMO	128
	V.2.1. Incorporación y utilizacion de hexosas	128
	V.2.2. Gluconeogénesis	129

VI.1.	COMPOSICION DE LOS LIPIDOS EN EUGLENA	133
VII.	ACIDOS NUCLEICOS EN EUGLENA	135
VII.1.	CONTENIDO Y VARIACION	135
VII.2.	RIBOSOMAS	135
VII.3.	REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS CLOROPLASTICAS	136
VIII.	RESPIRACION	138
VIII.1.	INTRODUCCION	138
VIII.2	TRANSFERENCIA DE ELECTRONES Y FOSFORILACION OXIDATIVA	138
VIII.3.	VIAS DE OXIDACION Y ASIMILACION OXIDATIVA	139
VIII.4.	RESPIRACION ENDOGENA	139
VIII.5 .	UTILIZACION DE SUSTRATOS EXOGENOS	140
IX.	FOTOSINTESIS	142
IX.1.	COMPONENTES CLOROPLASTICOS	142
IX.2.	CARACTERISTICAS DE LA REACCION DE MILL	145
IX.3.	FOTOFOSFORILACION	146
IX.4.	SISTEMA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN CLOROPLASTOS DE EUGLENA	146
IX.5.	FIJACION FOTOSINTETICA DEL CO_2	146
X	INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO Y METABOLISMO	148
X .1.	ANTIBIOTICOS	148
X .2.	ANALOGOS DE LAS PURINAS Y PIRIMIDINAS	151
X .3.	DESACOPLANTES E INHIBIDORES DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA	151
X .4.	AGUA PESADA	152
X .5.	ANTIHISTAMINAS	153
X .6.	PESTICIDAS	153
X .7.	AGENTES QUELANTES	153
XII.	CLOROPLASTOS	154
XII.1.	DESARROLLO MORFOLOGICO	154

XI.2.	DESARROLLO FISIOLOGICO		154
	XI.2.1.	Pigmentos	154
	XI.2.2.	Fotosintesis	155
	XI.2.3.	Síntesis proteica	155
	XI.2.4.	RNA y ribosomas	156
	XI.2.5.	DNA	156
	XI.2.6.	Lípidos	157
XI.3.	RETORNO DEL CLOROPLASTO A LA CONDICION DE PROPLASTIDO		157
XI.4.	REPLICACION		159
	XI.4.1.	Evidencias citológicas de la división de los cloroplastos.	159
	XI.4.2.	Bloqueo de la habilidad de formación de colonias verdes por luz U.V.	159
	XI.4.3.	El DNA de los cloroplastos y otras organelas.	165
	XI.4.4.	Ultraestructura de células irradiadas con luz U.V.	165
	XI.4.5.	Segregación somática y velocidad de enverdecimiento luego de la irradiación con luz UV.	166
XI.5.	POSIBLES MECANISMOS DE CONTROL PARA EL DESARROLLO Y REPLICACION DEL CLOROPLASTO		167
XII.	INHIBIDORES DEL SISTEMA CLOROPLASTICO		170
XII.1.	INTRODUCCION		170
XII.2.	INHIBIDORES DE LA FORMACION DEL CLOROPLASTO		170
	XII.2.1.	Crecimiento en ausencia de luz	170
	XII.2.2.	Efecto de las condiciones sobre el desarrollo cloroplástico	171
	XII.2.3.	5-Fluor uracilo y otros antimetabolitos	173
XII.3.	AGENTES BLANQUEANTES		178
	XII.3.1.	Luz U.V.	178.
	XII.3.2.	Estreptomicina	178
	XII.3.3.	Algo más sobre antibióticos	184
	XII.3.4.	Antihistaminas y otros agentes químicos blanqueantes	186
	XII.3.5.	Deficiencia de Mg.	188
	XII.3.6.	Presión	189

XII.3.7. Temperatura 189

XI.4. CONCLUSIONES 193

XIII. ESTUDIOS SOBRE LA BIOSINTESIS DE LOS TETRAPIRROLES EN EUGLENA GRACILIS 194

XIII.1. INTRODUCCION 194

XIII.2. RESEÑA DE LOS TRABAJOS RELACIONADOS DIRECTAMENTE CON LA SINTESIS ENZIMATICA DE LOS TETRAPIRROLES 194

XIII.3. ALGO MAS SOBRE LA BIOSINTESIS DE CLOROFILA 208

XIII.3.1. Las últimas etapas de la síntesis.Identificación del precursos directo de la clorofila 208

XIII.3.2. Algo más sobre la fase lag en la síntesis de clorofila y su regulación 213

MATERIALES Y METODOS

I. MATERIALES Y METODOS M1

I.1. MATERIALES M1

I.2. METODOS M1

I.2.1. Fuente de enzima:Euglena Gracilis Klebs strain,Z, Pringsheim M1

I.2.1.1. Cultivo y crecimiento M1

I.2.1.2. Extracción de la proteína enzimática M2

I.2.1.3. Preparación de polvo cetónico de Euglena Gracilis Z M2

I.2.2. Determinación de la actividad enzimática M3

I.2.2.1. Sistema standard de incubación M3

I.2.2.2. Estimación espectrofotométrica de las porfirinas en medio ácido M4

I.2.2.3. Estimación del PBG M5

I.2.2.4. Unidad enzimática M5

I.2.2.5. Fraccionamiento y determinación de las porfirinas formada s en las incubaciones M6

I.2.2.6. Determinación del tipo isomérico M6

I.2.3. Determinación del contenido proteico M8

I.2.3.1. Método de Lowry M8

I.2.3.2. Método de Lowry modificado M8

	I.2.3.3. Método de Warburg y Christian	M9
I.2.4.	Determinación de clorofila en extractos de E.gracilis	M9
I.2.5.	Cromatografía por Tamices Moleculares	M10
I.2.6.	Electroforesis en geles de poliacrilamida	M11
I.2.7.	Estimación de Pesos Moleculares	M12
	I.2.7.1. Tamices Moleculares	M12
	I.2.7.2. Electroforesis en geles de Poliacrilamida	M12
I.2.8.	Cromatografía de mono y dipirroles	M13

RESULTADOS Y DISCUSION

I.	ESTUDIOS PRELIMINARES	R1
I.1.	CONSIDERACIONES GENERALES	R1
I.2.	ATMOSFERA DE INCUBACION	R2
II.3.	EFECTO DE LA TECNICA DE HOMOGENEIZACION; SELECCION DEL BUFFER DE EXTRACCION	R2
II.4.	OBSERVACION DE LOS CULTIVOS DE CELULAS VIVAS DE EUGLENA Y DE HOMOGENATOS AL MICROSCOPIO	R4
II.5.	TIEMPO DE SONICACION	R4
II.6.	RELACION DEL PESO DE CELULAS AL VOLUMEN DE BUFFER DURANTE LA EXTRACCION	R4
II.7.	IMPORTANCIA DEL LAVADO DE LAS CELULAS DURANTE SU COSECHA	R5
II.8.	EFECTO DE INOCULOS CRECIDOS EN LUZ Y OSCURIDAD PARA EL DESARROLLO DE CULTIVOS DE EUGLENA OSCURIDAD SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA	R5
II.9.	CONTROL DEL PROCEDIMIENTO EMPLEADO PARA LA SEPARACION DE LOS PRODUCTOS FORMADOS Y SUSTRATO REMANENTE AL FINAL DE LAS INCUBACIONES	R6
II.10.	CONTROL DE POSIBLES INTERFERENCIAS EN LA MEDICION DEL PBG	R7

I.11. EFECTO DE SALES DE SODIO Y MAGNESIO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA R8

I.12. EFECTOS DE LA ILUMINACION Y LOS DIAS DE CRECIMIENTO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA R8

I.13. CONTENIDO DE PROTEINAS Y CLOROFILA EN PELLET Y CELULAS FRESCAS, EN FUNCION DE LOS DIAS DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE ILUMINACION R9

I.14. ESTUDIO COMPARATIVO EMPLEANDO CELULAS FRESCAS Y POLVOS CETONICOS R10

I.15. DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE LA REACCION R12

I.16. EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL SUSTRATO, CINETICA DE LA REACCION R13

I.17. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE PROTEINA ENZIMATICA R15

I.18. EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION R15

II. ENSAYOS DE PURIFICACION DE LAS ENZIMAS R17

II.1. CONSIDERACIONES GENERALES R17

II.2. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y PESOS MOLECULARES DE LA PBGasa DE SOBRENADANTE. R18

II.3. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y PESOS MOLECULARES DE LA PBGasa DE PELLET R19

II.3.1. Acerca del uso de agentes caotrópicos para el estudio de proteínas de membrana R19.

II.3.2. Esquema de purificación R20

II.4. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y PESOS MOLECULARES DE LA DEAMINASA R22

II.4.1. Efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento sobre el tipo isomérico y las porfirinas formadas R22

II.4.2. Purificación de la Deaminasa de sobrenadante por tratamiento con ácido acético R23

II.4.3. Purificación de la Deaminasa de sobrenadante sin tratamiento con ácido acético R24

II.4.4. Purificación de la Deaminasa de pellet, extraída con un agente caotrópico y sin tratamiento con ácido acético R24

II.4.5. La Deaminasa es un dímero de peso molecular 40.000 R25

II.5. PREPARACION DE ISOMERASA Y SU PESO MOLECULAR R25

II.6. EN EL COMPLEJO DE LA PBGasa, LA DEAMINASA Y LA ISOMERASA SE ENCUENTRAN EN UNA RELACION MOL A MOL R27

III. INTERMEDIARIOS POLIPIRROLICOS EN LA CICLOTETRAMERIZACION ENZIMATICA DEL PBG R30

III.1. CONSIDERACIONES GENERALES R30

III.2. EFECTO DE LOS IONES AMONIO Y DE LA HIDROXILAMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PBGasa DE PELLET R31

III.3. FORMACION ENZIMATICA DE INTERMEDIARIO R32

III.3.1. A partir de PBGasa de pellet R32

III.3.2. A partir de Deaminasa R33

III.4. UTILIZACION ENZIMATICA DE LOS INTERMEDIARIOS R34

III.5. UTILIZACION ENZIMATICA DE LOS INTERMEDIARIOS LIBRES R36

III.6. UTILIZACION ENZIMATICA DE LOS POLIPIRRILIMETANOS NATURALES, UNIDOS A LA ENZIMA R37

III.7. ALGUNAS EVIDENCIAS ACERCA DE LA ESTRUCTURA DE LOS INTERMEDIARIOS POLIPIRROLICOS NATURALES PRODUCIDOS POR LA PBGasa Y LA DEAMINASA DE EUGLENA GRACILIS R40

III.7.1. Consideraciones Generales R40

III.7.2. Reacción de los intermediarios con el reactivo de Ehrlich R41

III.7.3. Síntesis no enzimática de porfirinógenos a partir de los intermediarios polipirrólicos R42

III.7.4. Efecto de pH sobre la formación no enzimática de porfirinógenos a partir de los P y D-intermediarios de Euglena R43

TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS

"Las porfirinas poseen muchos títulos de nobleza: fisiológicos, bioquímicos, clínicos.
Ellas constituyen una parte funcionalmente esencial de ciertas macromoléculas indispensables para la vida.
Encontramos que esos compuestos porfirínicos cumplen funciones fisiológicas fundamentales en todas las células vivas, tanto animales como vegetales. También se acepta que las porfirinas constituyeron los primeros eslabones de la cadena evolutiva, que sintetizadas en las condiciones terrestres primitivas por una vía no enzimática a partir de compuestos orgánicos simples, hicieron posible el nacimiento y la evolución de los seres vivos."

Alfred Gajdos et Marianne Gajdos-Török
(Húngaros) en "Porphyrines et Porphyries"
Masson & Cie. Ed. (1969) - París

"La vida en la tierra, por lo menos en su estado actual, depende casi exclusivamente de los procesos de fotosíntesis en las plantas verdes...

El segundo proceso biológico fundamentalmente importante, es el de la respiración celular que también depende de los pigmentos pirrólicos."

Ruddy Lemberg (nacido en Breslau, 1896)
Sydney, 1949.

I.- INTRODUCCION

A principios de este siglo las causas de las enfermedades derivaban preponderantemente de factores asociados al medio ambiente o de tipo social, y por otro lado una gran mayoría caía dentro de la clase de infecciones; de manera que el concepto de enfermedad de origen bioquímico prácticamente no se tenía en cuenta. Fue justamente en medio de este clima de la opinión médica, que Sir Archibal Garrod introdujo en Inglaterra, en 1908, sus teorías acerca de los "errores congénitos del metabolismo", proponiendo que ciertos desórdenes genéticos, suelen expresarse a través de defectos enzimáticos, como aberraciones químicas del organismo.

Sabemos que el metabolismo celular está regulado por un intrincado mosaico de enzimas, sujetas todas a un fino control genético. Una falla en este control puede llevar a la formación defectuosa de una o más enzimas específicas, dando lugar así a un error innato del metabolismo, que puede manifestarse en distintas formas. Las expresiones clínicas de estas enfermedades, también son variables y cualquier sistema del organismo puede estar afectado; así como también puede esperarse una desviación genética ocasional en cualquier camino metabólico.

Las PORFIRIAS abarcan un grupo de enfermedades, en las cuales ocurren desórdenes en el metabolismo de las porfirinas, este desorden en un amplio grupo, es hereditario y por ende pertenecen a la familia de errores congénitos del metabolismo; pero también puede ser adquirido.

Las manifestaciones clínicas y bioquímicas, específicas para cada tipo de Porfiria, están relacionadas con el tejido en el cual ocurre y se expresa fundamentalmente la falla metabólica; así como con la o las etapas en el camino biosintético de las porfirinas, en las cuales ha ocurrido dicha falla.

Para que se puedan apreciar fácilmente las causas de los desórdenes en el metabolismo de las porfirinas, es esencial un conocimiento previo de la química y bioquímica de esos pigmentos, así como del camino normal de la biosíntesis del hemo. Análogamente, para llevar a cabo estudios bioquímicos con mayor eficiencia, es asimismo necesario un completo dominio del significado químico y biológico de estos compuestos. Finalmente, el químico orgánico está igualmente interesado en la función biológica de las porfirinas para poder seleccionar cuales son los problemas o las estructuras más relevantes a

investigar. Consideramos que estas premisas, son suficientes como para introducirnos en los principios básicos sobre la química, aislamiento, purificación, propiedades físicas y determinación de porfirinas y precursores; su biosíntesis y regulación, y contando con estos fundamentos, plantear y discutir las consecuencias de los desórdenes del metabolismo del hemo o Porfirias, a la altura del conocimiento actual del problema; su clasificación y sintomatología clínica.

" Mi corazón de médico, para expresarlo en términos poéticos, se apoya inflexiblemente en la infalibilidad y necesidad de los métodos químicos."

J.L. Thudichum (nacido en Bundingen en 1829)
Fundador de la Clínica Bioquímica.
(Del Prólogo de la Primera Edición de "Chemical Constitution of the Brain", Londres, 1884).

II.- HISTORIA

Las particulares propiedades físico-químicas de las porfirinas, como veremos enseguida, llevaron a su detección en orinas normales y patológicas ya a fines del siglo pasado.

La historia médica de las porfirinas comienza a principios de 1840, cuando Scherer (1841) demostró que una sustancia del color rojo de la sangre, se obtenía por tratamiento químico de la hemoglobina con ácido sulfúrico concentrado. Esta sustancia, llamada hematina por Mulder (1844), fue denominada más tarde "porfirina" (Dean, 1971), del griego "Porphuros", que significa rojo-púrpura.

En realidad, el término "porfirina" aparece por primera vez en la literatura en 1871 cuando Hoppe-Seyler describe la preparación de Hematoporfirina a partir de la sangre. Sin embargo, la primera obtención química de una porfirina cristalina se debe a Thudichum, en 1867, quien la llama "cruentina" y la describe como "un compuesto que florecía con un espléndido color rojo", empero este descubrimiento no fue justamente reconocido por sus contemporáneos, aunque afortunadamente recibió su merecido crédito algunos años después (Drabkin, 1958).

El primer caso auténtico de una porfiria fue reportado por Schultz en 1874, diagnosticado originalmente como una lepra atípica, pero que de acuerdo con su clara descripción, se trataba de un clásico caso de porfiria congénita. Los pigmentos urinarios de esta paciente fueron estudiados por Baumstark (1874), quien obtuvo dos fracciones denominadas uro-rusohematina y urofuscohematina, pues sus espectros de absorción eran similares a los de la hematina libre de hierro.

El estudio de las porfirias tomó mayor impulso con la introducción del hipnótico sulfonal en 1886 (Bauman, 1886; Kast, 1888) como resultado de lo cual, apareció una nueva enfermedad, la forma tóxica de una porfiria aguda. Es Stokvis, en 1889, quien describe una paciente, adicta, que después de haber ingerido unos pocos gramos de sulfonal, excretó una orina de color rojizo, de la cual el autor aisla un pigmento de propiedades similares a la hematoporfirina; la enferma presentaba además una sintomatología típica de una porfiria aguda hepática y al poco tiempo muere de parálisis.

Con el ingreso de los barbitúricos en el mercado de los fármacos se observan entonces casos de porfiria inducida por esta droga en 1906 (Dobrschansky). Estos fueron así los primeros ejemplos de una enfermedad, que solamente puede llegar a ser fatal, después de la prescripción de ciertas drogas, en particular sulfonamidas y barbituratos.

Una nueva era en la investigación de las porfirinas y porfirias, se inició con los estudios del famoso paciente Mathias Petry, mencionado por primera vez por Günther en 1911, en su pionero trabajo en el cual introduce el término "Hematoporfiria", para designar al grupo de enfermedades conocido ahora como Porfirias y al mismo tiempo propone la primera clasificación para esta familia de anomalías metabólicas (Garrod, 1900).

Petry fue el paciente más estudiado de la historia y constituyó una fuente tan rica como valiosa de porfirinas para Hans Fischer, a quien se le debe todo el conocimiento básico acerca de la estructura y propiedades de los tetrapirroles y por lo cual fuera honrado con el Premio Nobel en 1930 (Fischer y Orth, 1934, 1937, 1940).

En la década de 1930, comienzan sus trabajos la siguiente generación de importantes porfirinólogos con las escuelas de Rimington, químico, en Inglaterra, y los médicos Walldenström, en Suecia; Walton y Schwartz en USA. Rimington y Faurie (1936), descubren en Sud Africa, el primer caso de un animal viviente con Porfiria Congénita Eritropoiética (P.C.E.), llevando a cabo un profundo estudio de ese material único. Fue también Rimington (1939) quien demuestra que el pigmento rojo presente en las plumas del ave sud africana Turacus, era un complejo cúprico de la Uroporfirina III.

Sachs (1931) encontró un compuesto que daba reacción de Erlich positiva, en la orina de un paciente durante un ataque de porfiria, y este hallazgo fue explotado por Walldenström (1937) en su pionero trabajo; aquí usa por primera vez el término Porfiria Aguda Intermitente (P.A.I.) y para 1956, ya había estudiado más de 100 casos, todos vinculados a una única familia sueca. La importancia del trabajo de Walldenström radica en su profundo estudio de la porfiria aguda, la demostración de su carácter hereditario, autosómico dominante, con manifestaciones variables, a menudo latente; además de la creación del término porfobilinógeno y haber puntualizado tempranamente el rol de los barbituratos en el desenlace de los ataques porfíricos.

Schmid, Schwartz y Watson introdujeron en 1954, el concepto de porfirias hepáticas y eritropoiéticas y fueron los primeros en señalar la existencia de latencia para todas las formas de las porfirias hereditarias.

De particular importancia en el desarrollo de la clínica de las Porfirias fue la descripción de la Porfiria Variegata (P.V.) en Sud Africa (Dean y Barnes, 1954) y la porfiria tóxica por hexaclorobenceno en Turquía (Cam, 1957).

Con esto, ya hemos llegado a la década de 1960 y si bien la Química, la Medicina, y la Ciencia en general, se desarrollan muy rápidamente y el avance logrado en estos últimos 20 años en el campo de las Porfirinas y Porfirias ha estado de acuerdo con ese desarrollo, también ha entrado en una etapa genética, enzimológica, no lo suficientemente madura, como para poseer una perspectiva histórica, pero lo bastante importante como para dedicarle mayor atención en los capítulos siguientes.

Y para concluir con este aspecto, señalemos algunos datos interesantes acerca de las porfirias en animales. Es notable que las porfirias hereditarias sólo se han descripto en el hombre y animales domésticos, nunca en animales salvajes. Además, la Porfiria Congénita Eritropoiética es la única forma de porfiria hereditaria que se ha encontrado en animales domésticos, en tanto que las porfirias hepáticas hereditarias jamás se han manifestado en animales.

"El creciente conocimiento acerca de la química de las porfirinas adquirido durante los primeros cincuenta años de este siglo culminó con la elucidación de las estructuras del hemo y clorofila y ha sido la piedra fundamental sobre la cual se ha edificado el estudio de la biosíntesis de estos pigmentos."

Gerald Marks (Canadiense)
(En "Heme and Chlorophyll", 1969, Ed. D. Van Nostrand Co. Ltd., London).

III.- TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS

La estructura tetrapirrólica es una de las bases primordiales para la supervivencia en la mayoría de los sistema biológicos terrestres. Es la responsable del color rojo de la hemoglobina y del verde de la clorofila, los dos pigmentos más importantes de la materia viviente, involucrados en los procesos fundamentales de la respiración y fotosíntesis. Agreguemos que las porfirinas en general, que son tetrapirroles, participan asimismo en un número de reacciones metabólicas de gran significado fisiológico, como transportadores de electrones, energía y gases, oxidaciones biológicas, fijación de nitrógeno, etc...

III.1.- NOMENCLATURA Y ESTRUCTURA

Los tetrapirroles naturales o sintéticos, derivan de dos núcleos básicos: PORFINA y CLORINA (Figura 1), que contienen cuatro anillos pirrólicos (A, B, C, D), unidos entre sí por medio de 4 puentes metenos (α, β, γ, δ), los carbonos externos β, β' de los anillos pirrólicos se identifican con los números 1 al 8, comenzando por el núcleo A. La diferencia entre la estructura de la porfina y la clorina consiste simplemente en la presencia del anillo D, reducido en la última.

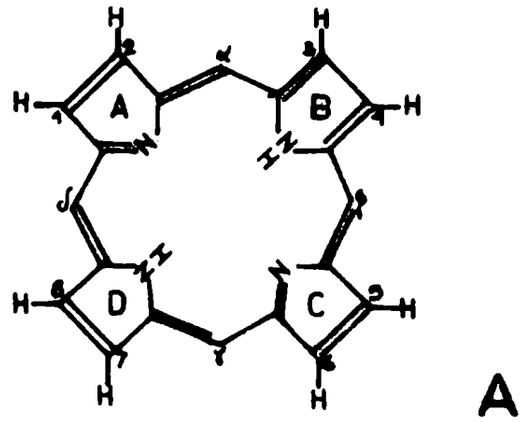
La existencia de un sistema de dobles ligaduras alternadas en este compuesto cíclico de 16 átomos internos, da como consecuencia una estructura resonante, muy estable y planar.

Las distintas estructuras de los tetrapirroles que encontramos en la naturaleza, derivan de estos dos esqueletos básicos, que han sido modificados de alguna manera:

a) Por sustitución parcial o total de los átomos de carbono externos (1 al 8) por restos alquilos.

b) Por sustitución o reemplazo sobre los puentes meténicos; los sustituyentes pueden ser átomos de hidrógeno, como aparecen en los porfirinógenos, o un anillo de ciclopentanona como en las clorofilas; o un reeemplazo como ocurre en el anillo porfirínico de la corrina, típico de los derivados de la vitamina B_{12}, en el cual se ha perdido el puente meténico δ.

c) Por inserción de un metal, conduciendo a la formación de las metaloporfinas.



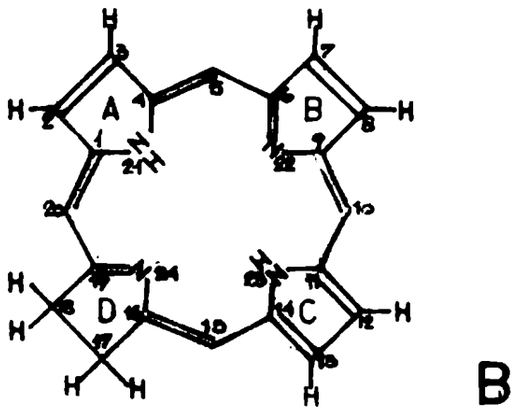


Fig. 1. Representación de las estructuras de porfina (A) y clorina (B). Nomenclatura del nucleo según Fisher (A) e IUPAC (B).

III.1.1.- Porfirinas:

Las Porfirinas son derivados de los tetrapirroles libres de metales, que se diferencian estructuralmente según la naturaleza y el ordenamiento de las cadenas laterales que han sustituído las posiciones 1 a 8 de los anillos pirrólicos. Por ejemplo, la Uroporfirina, (Figura 2) tiene cuatro restos acético y cuatro restos propiónico, es decir sólo dos tipos diferentes de sustituyentes: acético y propiónico.

Empleando el sistema propuesto por Fischer para identificar a los distintos átomos de carbono del núcleo de la porfina, ilustrada en la Figura 1, podemos ver fácilmente que todas aquellas porfirinas, como las que acabamos de mencionar, las Uroporfirinas, así como las Coproporfirinas y las Etioporfirinas, son derivados de las porfinas en la cual cada uno de los cuatro anillos pirrólicos lleva dos restos sustituyentes diferentes, que podemos llamar A y B; en estos casos es posible la existencia de cuatro ordenemientos distintos de estos dos grupos, que dan lugar a cuatro isómeros de posición como tipos I, II, III y IV (Figura 3).

La situación es mucho más complicada en el caso de las Proto-y Mesoporfirinas (Figura 4) en las cuales se encuentran tres sustituyentes distintos, dos grupos A y B en los anillos A y B y dos grupos A y C en los anillos C y D. Este ordenamiento de los sustituyentes da lugar a la posible existencia de 15 isómeros de posición. Fischer y colaboradores (1937) lograron sintetizar químicamente los 15 isómeros de la protoporfirina, sin embargo, en la naturaleza, hasta ahora, solamente se ha encontrado al designado como Protoporfirina IX, o más correctamente 1,3,5,8- tetrametil-2,4-vinil porfin-6,7-dipropiónico ácido; que además proviene necesaria y únicamente de porfirinas pertenecientes al tipo isomérico III, sin embargo es conveniente referirse a las distintas porfirinas por sus nombres triviales. Este último hecho es muy importante, notemos que la naturaleza, ha seleccionado entre varias, a la serie isomérica III; en otras palabras, todos los tetrapirroles fisiológicamente activos son tipo III. Pero debemos aquí agregar, que naturalmente se han encontrado también derivados de la serie I, que no cumplen rol fisiológico alguno y son el resultado de alteraciones en el camino metabólico normal de los tetrapirroles, como veremos más adelante. Hasta ahora nunca se han aislado de fuentes naturales derivados tipo II ni IV.

III.1.2.- Porfirinógenos:

El tratamiento de las porfirinas con agentes reductores, como por ejemplo amalgama de sodio o borhidruro de sodio, da lugar a la adición de 6 átomos de hidrógeno sobre el anillo de la porfirina. Estos hexahidroderivados, se conocen como Porfirinógenos (Figura 5) y son de gran importancia biológica, pues se trata de los verdaderos intermediarios en la biosíntesis normal del hemo y clorofila. Son compuestos incoloros que cuando

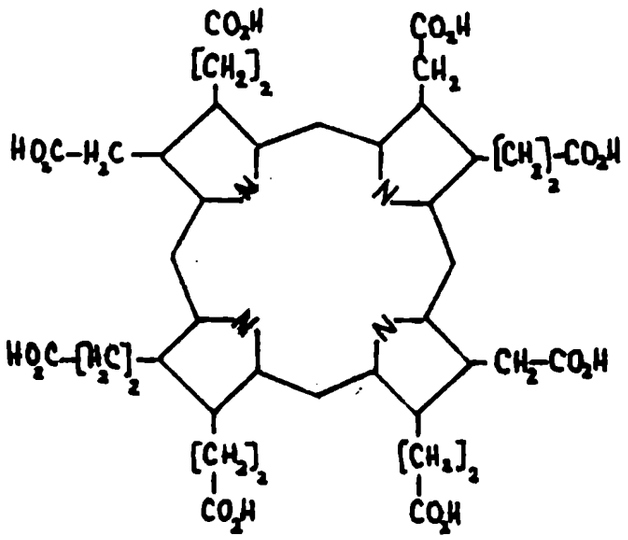
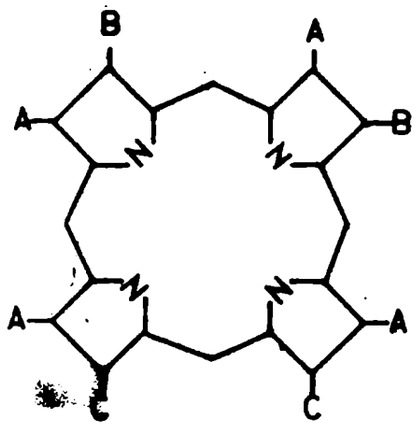


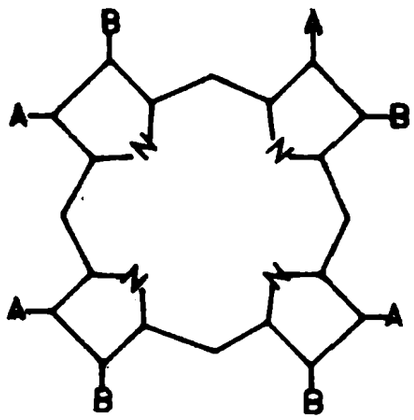
Figura 2: Uroporfirina



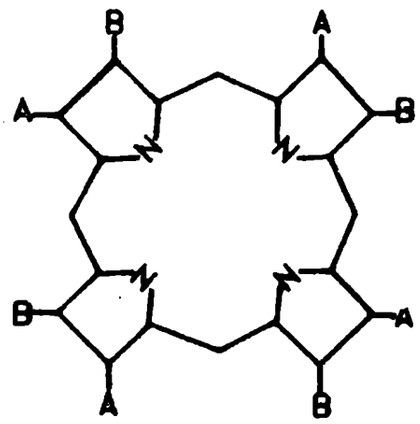
Para PROTOPORFIRINA A=-CH3
B=-CH:CH2
C=-CH2CH2CO2H

Para MESOPORFIRINA A=-CH3
B=-C2H5
C=-CH2CH2CO2H

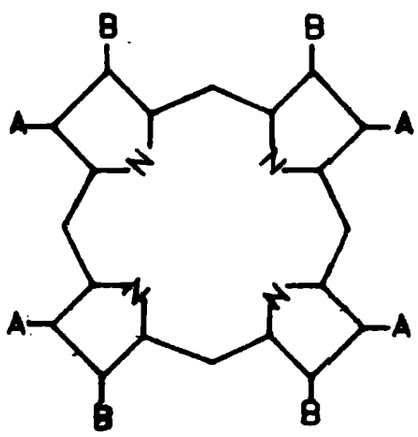
Figura 4: Representación esquemática de la estructura de Proto y Mesoporfirina.



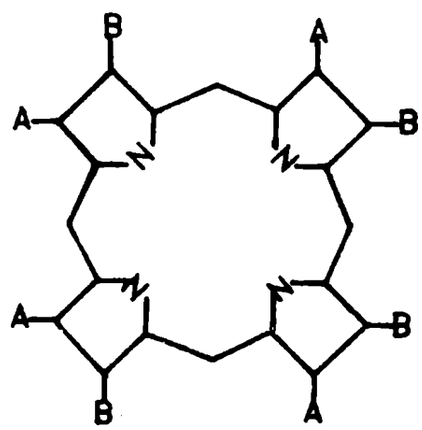
III



I



II



IV

Figura 3: Representación esquemática de los isómeros de las Uro, Copro y Etioporfirinas.

Para ETIOPORFIRINA A= $-CH_3$
B= $-C_2H_5$

Para COPROPORFIRINA A= $-CH_3$
B= $-CH_2-CH_2-CO_2H$

Para UROPORFIRINA A= $-CH_2-CO_2H$
B= $-CH_2-CH_2-CO_2H$

se liberan o excretan, se oxidan espontáneamente a las correspondientes porfirinas, la reoxidación puede acelerarse por medio del agregado de oxidantes suaves, como soluciones diluídas de iodo.

III.1.3.- Metaloporfirinas:

Las porfirinas, libres o esterificadas, se combinan fácilmente con varios metales para formar quelatos, pero solamente los complejos metálicos con el hierro y el magnesio cumplen importantes funciones biológicas.

Los complejos de los tetrapirroles con el hierro, se denominan genéricamente Hemos o hierro-porfirinas. El mejor conocido es el proto-hemo o hierro-protoporfirina, en el cual el metal puede encontrarse en forma reducida, como en el Hemo o ferro-protoporfirina o al estado oxidado como en la Hemina o la Hematina o ferriprotoporfirina (Figura 6).

El Hemo, que es el grupo prostético de la Hemoglobina, se oxida fácilmente en contacto con el aire a Hematina o a Hemina, si en el medio hay presentes iones cloruro. Este cloro derivado, es muy estable y es la forma usual bajo la cual se aisla el grupo prostético de la Hemoglobina, método frecuentemente empleado en los estudios bioquímicos.

El Hemo posee una estructura en la cual los cuatro anillos pirrólicos y el hierro están ubicados en un plano, pero el metal posee aún capacidad para unirse por medio de enlaces coordinados con dos moléculas que se ubican abajo y arriba del plano que contiene al anillo porfirínico; estos tipos de derivados se conocen como Hemocromos o Hemocromógenos. Entre los compuestos que pueden formarlos, encontramos al peróxido de hidrógeno o agua oxigenada, el oxígeno, monóxido de carbono, iones cianuro y una gran gama de bases nitrogenadas como la piridina y al amonio.

La Hematina también da lugar a complejos similares, conocidos como Hemicromos o Hemicromógenos.

III.1.4.- Hemoproteínas:

Las proteínas complejas, cuyo grupo prostético es una hierro-porfirina, constituyen la familia de las Hemoproteínas. Esta es una terminología genérica, muy conveniente, que no implica que el hierro se encuentre al estado reducido ni que la hierro porfirina sea el proto-hemo. Las proteínas específicas para cada hemoproteína están unidas al hierro, a través de ciertos grupos funcionales convenientes, provenientes de residuos de amino-ácidos; pueden existir además uniones covalentes adicionales entre los restos de los amino-ácidos y de las cadenas laterales del anillo porfirínico, como los carboxilos de los grupos propiónico o los sustituyentes vinilos (Figura 7).

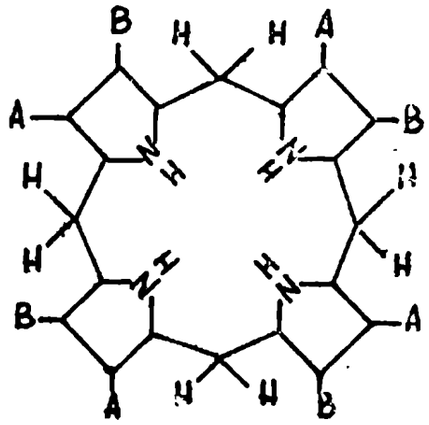


Figura 5: Representación esquemática de la estructura de un porfirinógeno.

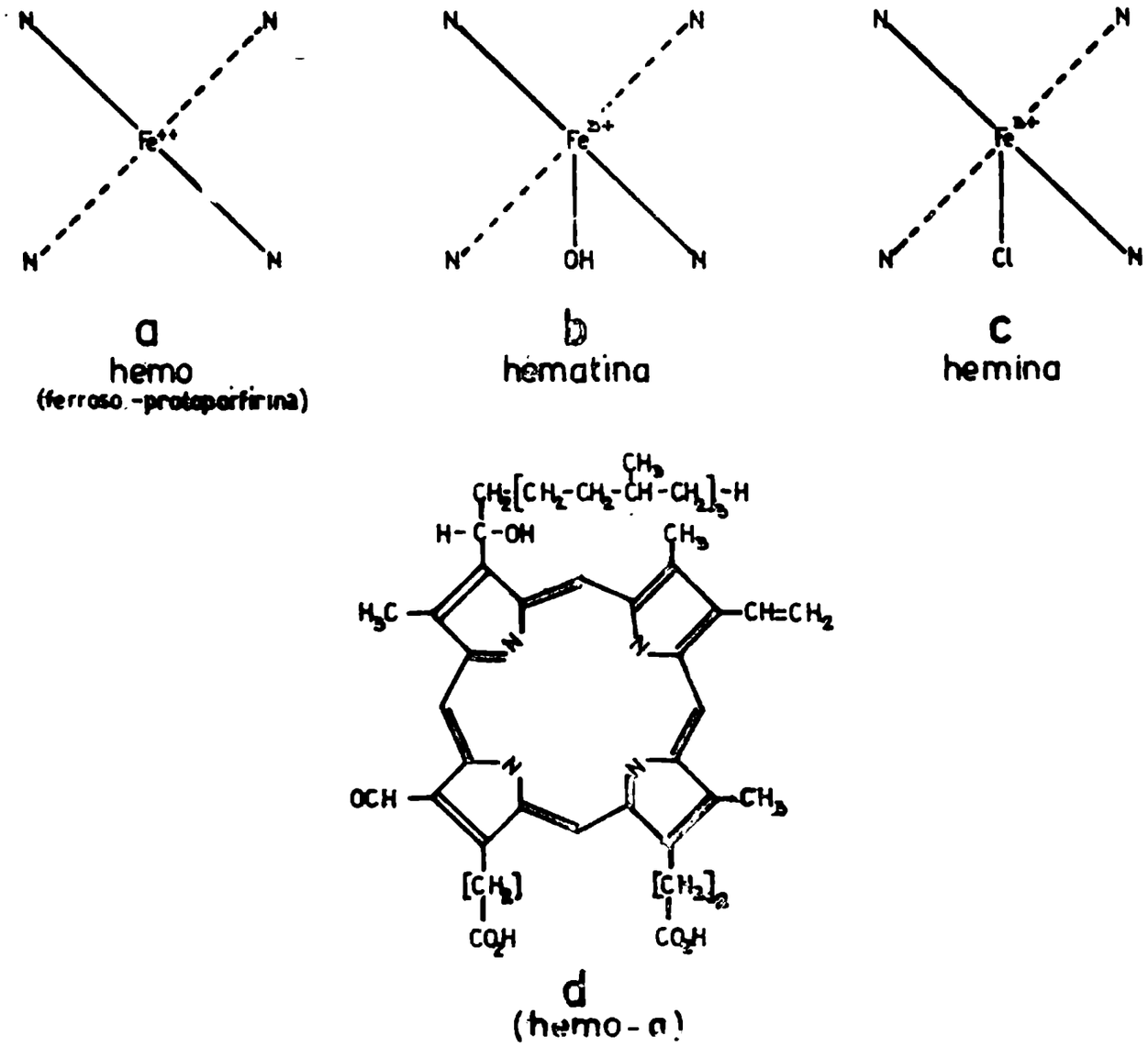


Figura 6: Representación esquemática de Hemo (a), Hematina (b), Hemina (c) y Hemo-a (d).

III.1.5.- Clorofilas:

Las clorofilas son tetrapirroles derivados de la clorina y difieren de la estructura del Hemo en cuatro aspectos importantes (Figura 8):

a) Son complejos de magnesio.

b) El anillo D (en las clorofilas de las plantes) y los anillos B y D (en la clorofila de las bacterias) se encuentran al estado reducido.

c) Tienen un anillo adicional (E) de ciclopentanona formado por ciclización de la cadena lateral de ácido propiónico sobre el carbono 6 con el carbono del puente meténico γ .

d) La cadena lateral propiónica sobre el carbono 7 del anillo D, está esterificada con un alcohol isoprenoide de cadena larga, que generalmente es el fitol.

En la naturaleza existen diferentes tipos de clorofilas, las más comunes y mejor conocidas son las clorofilas a y b y la bacterioclorofila; las distintas clorofilas se diferencian en cuanto al tipo variable de sustituyentes en los carbonos externos de los anillos pirrólicos.

La nomenclatura empleada para designar a los derivados de las clorofilas se basa en la presencia o ausencia del Magnesio y del grupo fitol (Tabla I). Los derivados correspondientes a la bacterioclorofila, simplemente llevan el prefijo "bacterio", por ejemplo: 'bacterioclorofilida'.

Tabla I: Derivados de la clorofila a

Nombre	Magnesio	Fitol
Clorofila a	+	+
Clorofilida a	+	-
Feofitina a	-	+
Feoforbida a	-	-

In vivo, todas las clorofilas están unidas a complejos lipoproteicos, aunque aún se desconoce cual es la naturaleza del enlace; sin embargo, experimentalmente, se sabe que pueden extraerse con facilidad por medio de solventes orgánicos, lo cual sugiere que no habría fuertes uniones covelentes involucradas.

III.1.6.- Tetrapirroles de Cadena Abierta:

Estos compuestos altamente coloreados, se producen en la naturaleza por degradación de la Hemoglobina, en cuyo caso se conocen como pigmentos biliares; o bien constituyen los grupos prostéticos de las ficobilinas en las algas rojas y azul-verdosas.

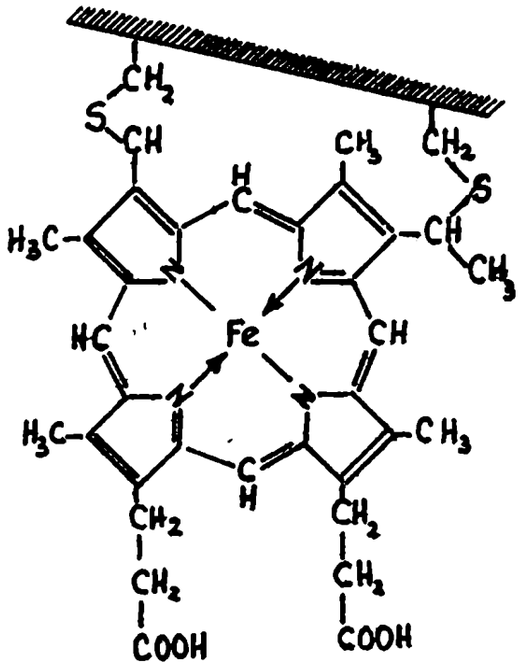
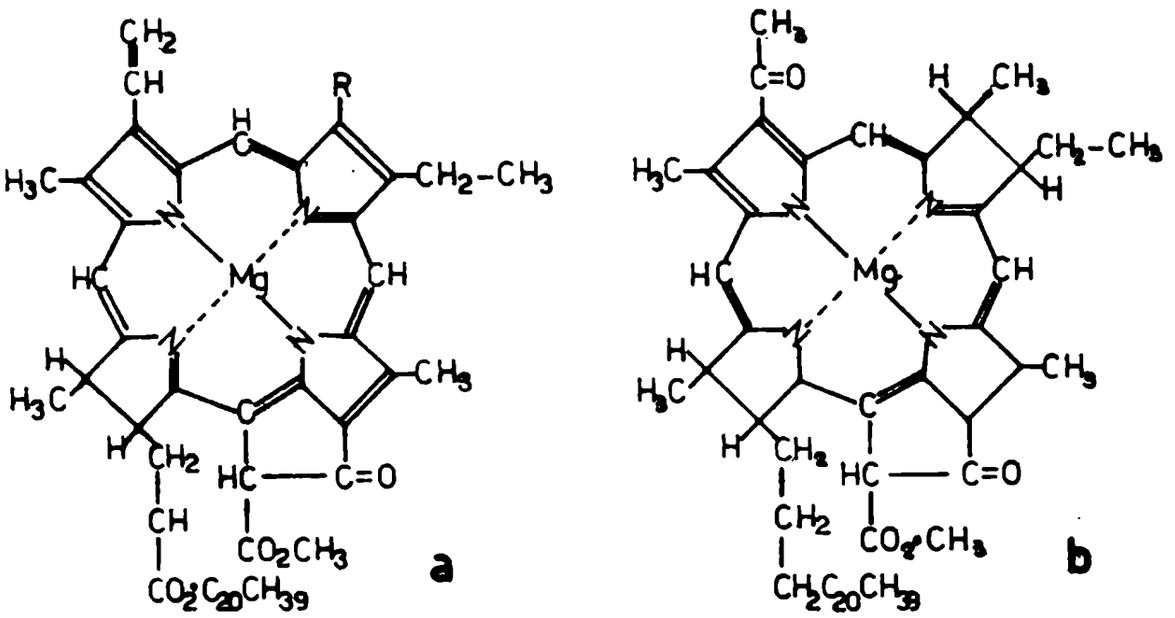


Figura 7: Representación esquemática de la estructura del citocromo c, hemoproteina fundamental en la cadena respiratoria.



Para CLOROFILA a R=-CH_3

Para CLOROFILA b R=-CHO

BACTERIOCLOROFILA

Figura 8: Estructura de las clorofila a, b y bacterioclorofila

En el caso de los pigmentos biliares, el primer paso en el proceso degradativo del hemo, es la oxidación del carbono del puente meténico α por acción de una α-metenil oxidasa, con liberación de monóxido de carbono. El producto de esta oxidación se convierta rápidamente en el tetrapirrol de cadena abierta, conocido como biliverdina IX α (Figura 9), que luego sufre una reducción enzimática a bilirrubina IX α. Sabemos que la bilirrubina es transportada al hígado donde se convierte en un diglucurónido soluble en agua, de manera que luego se excreta en el duodeno por la bilis.

Las ficobilinas de las algas rojas y azul-verdosas, son en realidad cromoproteínas solubles en agua, que poseen pigmentos biliares como grupos prostéticos. Hay dos tipos de ficobilinas, la ficocianina (azul) y la ficoeritrina (roja), para las cuales se han sugerido las estructuras que se ilustran en la Figura 10 .

III.2.- PROPIEDADES FISICAS DE LOS TETRAPIRROLES

III.2.1.- Solubilidad:

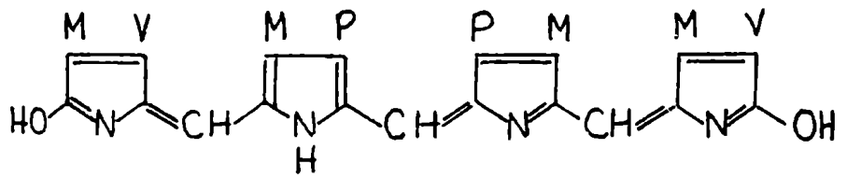
La estructura relativamente grande, planar y aromática del núcleo tetrapirrólico le confiere propiedades predominantemente hidrofóbicas. Sin embargo esta característica está modificada por la presencia de sustituyentes laterales alifáticos, portadores de grupos hidrofílicos, alcohólicos y carboxílicos.

Los solventes orgánicos maś comúnmente empleados para la extracción de tetrapirroles son éter y dioxano, aunque las clorofilas, en virtud de la presencia de ese resto fitol de cadena larga, también son solubles en éter de petróleo.

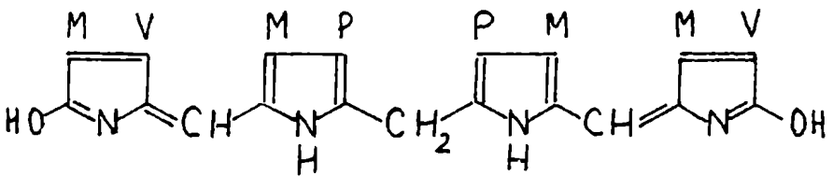
Tanto las porfirinas como sus complejos metálicos son fácilmente solubles en solventes orgánicos acidificados, como por ejemplo: acetona - HCl; éter-HCl; acetato de etilo-HCl; etc.

La solubilidad de los tetrapirroles en ácidos o álcalis diluídos depende del número de grupos de ácidos carboxílicos libres sustituyentes, así vemos que de las porfirinas con las que nos encontramos más frecuentemente, la Uroporfirina, con 8 restos carboxilos es la más soluble, en tanto que la Protoporfirina, con dos restos carboxilos es la menos soluble.

El método de la partición entre éter y HCl, es la base del clásico procedimiento empleado para la separación, identificación y cuantificación de las distintas porfirinas y sus derivados, desarrollado originalmente por Willstatter y Miegg en 1913. Básicamente el procedimiento consiste en ir extrayendo sucesiva y selectivamente las distintas porfirinas presentes en la fase etérea, con soluciones acuosas de ácido clorhídrico de concentraciones crecientes. Precisamente estos autores definieron el llamado "número de HCl", que es una constante física característica para cada porfirina, como el pro ciento de HCl capaz de extraer las 2/3 partes de una dada

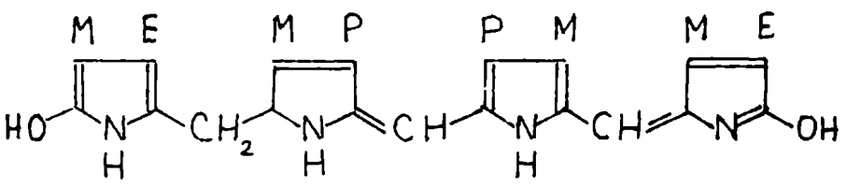


Biliverdina IXα

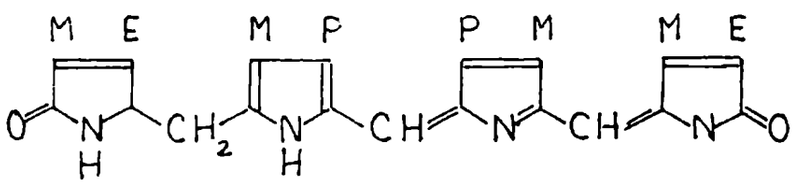


Bilirrubina IXα

Figura 9: Estructuras de la Biliverdina IXα y de la Bilirrubina IXα.



Ficocianobilina (cromóforo de la ficocianina)



Ficoeritrobilina (cromóforo de la ficoeritrina)

Figura 10: Estructuras probables de la Ficocianobilina y Ficoeritrobilina.

M= $-CH_3$
E= $-C_2H_5$
V= $-CH:CH_2$
P= $-CH_2 \cdot CH_2 \cdot CO_2H$

porfirina de una capa de éter saturada de agua, a un volumen igual de capa ácido-acuosa. En la Tabla II se ilustran los números de HCl, correspondientes a tres de las porfirinas más conocidas.

Tabla II: Números de HCl de Uro, Copro y Protoporfirina.

Porfirina	Número de HCl	
	libre	éster metílico
Uroporfirina	*	5,0
Coproporfirina	0,09	1,7
Protoporfirina	2,50	5,5

* La uroporfirina libre es muy poco soluble en éter

III.2.2.- Espectros de absorción:

La presencia de un sistema conjugado de dobles ligaduras en el núcleo de las porfirinas, es el cromóforo responsable de la existencia de fuertes y características bandas de absorción en las regiones visible y ultravioleta cercano del espectro. El espectro de absorción de los tetrapirroles es de fundamental importancia para su identificación y estimación cuantitativa. Todas las porfirinas exhiben un máximo de absorción en la región entre los 350 y 450 nm, conocida como la banda de Soret, que es la que se emplea generalmente para la cuantificación de estos pigmentos. El número y patrón de bandas que se pueda observar en la zona del visible, varía con el tipo de tetrapirroles, con el solvente y con el pH (Figura 11); pero es absolutamente característico para cada uno de ellos, en un solvente y pH dados.

Las porfirinas en solventes orgánicos o en soluciones alcalinas débiles, presentan un típico espectro de 4 bandas en la región del visible, cuya intensidad se incrementa barriendo de la zona roja hacia la azul. En estas condiciones las soluciones de porfirinas exhiben un hermoso color rojo o rojo amarronado según la concentración. Las cadenas laterales sustituyentes en los anillos pirrólicos no influencian ni el patrón ni la intensidad relativa de las bandas, pero sí, modifican su posición y la intensidad absoluta, en consecuencia constituyen un buen carácter para la identificación de las porfirinas (Tabla III).

Tabla III: Máximos de absorción de Uro, Copro y Protoporfirina en HOK 0,1M

Porfirinas	Posiciones de las bandas (nm)				
	α	β	γ	δ	Soret
Uroporfirina	612	560,5	539	504	405
Coproporfirina	617,5	565,5	538,5	503	401
Protoporfirina	642	591	540	510	408

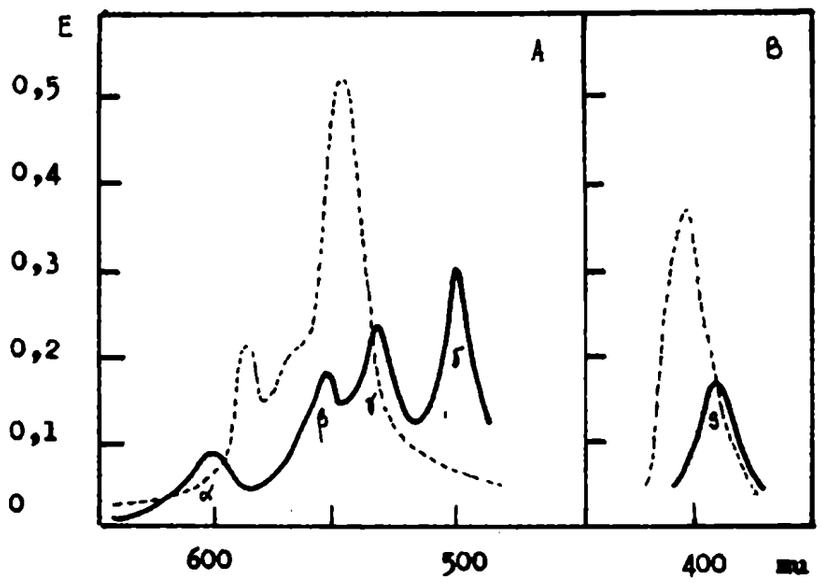


Figura 11: Espectro de absorción de una solución de Coproporfirina III libre en HONa 0,02N (línea contínua) o en HCl 0,15N (línea punteada). En la región visible (A), la concentración fué de 30 µM, mientras que para la zona de Soret (B) se usó una concentración de 1,8 µM.

En soluciones ácidas, las porfirinas muestran un color rojo-púrpura y el espectro 'neutral' de cuatro bandas en el visible se reemplaza por uno de dos bandas, mucho más agudas, intensas y bien definidas, con una tercera y débil banda, situada entre ambas; la banda de Soret también es mucho más intensa.

Los complejos de porfirinas con metales divalentes también exhiben un espectro visible de dos bandas con un máximo muy agudo para la banda α entre 550 y 560 nm, lo mismo sucede con los hemocromos y en estos casos justamente la banda α es muy importante para la identificación y estimación de los hemo-compuestos, incluyendo los citocromos.

Las porfirinas con sistemas de dihidro y tetrahidro anillos, como en las clorofilas se caracterizan por un espectro de absorción típico a mayores longitudes de onda, siendo la más intensa la banda alrededor de los 660 nm para los dihidro-sistemas, en tanto que en la estructura tetrahidro de la bacterioclorofila, la α banda se desplaza aún más y la encontramos alrededor de los 770 nm en solventes orgánicos.

Es interesante señalar, que los tetrapirroles de cadena abierta presentan espectros variables y característicos en la región del visible, con una intensa absorción, máxima entre 400 y 650 nm, según el compuesto; pero a gran diferencia con los ciclotetrapirroles, no poseen la banda de Soret.

III.2.3.- Fluorescencia:

Una propiedad característica de las porfirinas libres y sus ésteres, es la intensa fluorescencia roja emitida por radiación con luz ultravioleta de longitud de onda de alrededor de 400 nm. Esta propiedad permite detectar porfirinas presentes en cantidades del orden de 10^{-8}M, de allí que los métodos fluorimétricos ahora frecuentemente empleados para la cuantificación de porfirinas sean los más sensibles. La intensidad de la fluorescencia también depende del solvente y del pH, es mínima en el punto isoeléctrico y máxima en ácidos minerales, como el HCl a pH 1,0.

Sólo algunas metaloporfirinas también fluorescen, aunque mucho menos intensamente que las correspondientes porfirinas libres.

Los porfirinógenos, que ya dijimos son derivados reducidos de las porfirinas, son incoloros y no fluorescen.

" La compleja estructura tetrapirrólica es difícil de sintetizar en el laboratorio, sin embargo la mayoría de las células vivientes puede construírlas a partir de precursores muy simples. En las últimas décadas, ha tenido lugar un considerable progreso acerca de nuestros conocimientos sobre el camino biosintético de las porfirinas, demostrándose que la misma secuencia opera en todas las formas de vida."

June Lascelles (Australiana)
(En "Tetrapyrrole biosynthesis and its regulation", 1964.- W.A. Benjamin, Inc. N.Y. Amsterdam).

IV.- BIOSINTESIS DE LOS TETRAPIRROLES

IV.1.- INTRODUCCION

Ya hemos señalado la vital importancia de los tetrapirroles en la naturaleza; y comentado que la elucidación de la secuencia normal de eventos enzimáticos que culmina con la formación del Hemo, ha contribuído, significativamente a nuestro entendimiento de la fisiopatología de varios desórdenes hepáticos y eritroides. Análogamente, la existencia de defectos genéticos y adquiridos, en la regulación de la biosíntesis del Hemo, ha estimulado estudios, que a su vez nos han provisto de información bioquímica fundamental acerca del funcionamiento normal y regulación enzimática de este fascinante camino metabólico.

El papel vital y ubícuoto de las porfirinas, y el hecho de que la mayoría de los sistemas biológicos no las requieren como factores de crecimiento, nos está indicando, por un lado, que las células vivientes son capaces de sintetizar sus propios tetrapirroles, y además que pueden hacerlo a partir de precursores simples.

La elucidación de las primeras etapas en el camino de la biosíntesis del Hemo, fueron el resultado de una serie de brillantes trabajos con compuestos radioactivos provenientes de los laboratorios de Shemin, Rimington, Neuberger, Granick. Estos estudios, establecieron las bases para los posteriores avances en este campo y demostraron que el mismo camino biosintético opera en todas las formas vivientes. Es decir, todas las células aeróbicas, de animales, plantas y bacterias, son capaces de sintetizar sus tetrapirroles, a través de un camino, cuyas etapas, hasta la formación de Protoporfirina IX, son exactamente coincidentes, luego, dependiendo de cual fuere el producto final; Hemos, Clorofilas, Bacteriocloroflla, Corrinas; se producen las ramificaciones específicas.

En la figura 12 se ilustra esquemáticamente el camino biosintético de los tetrapirroles.

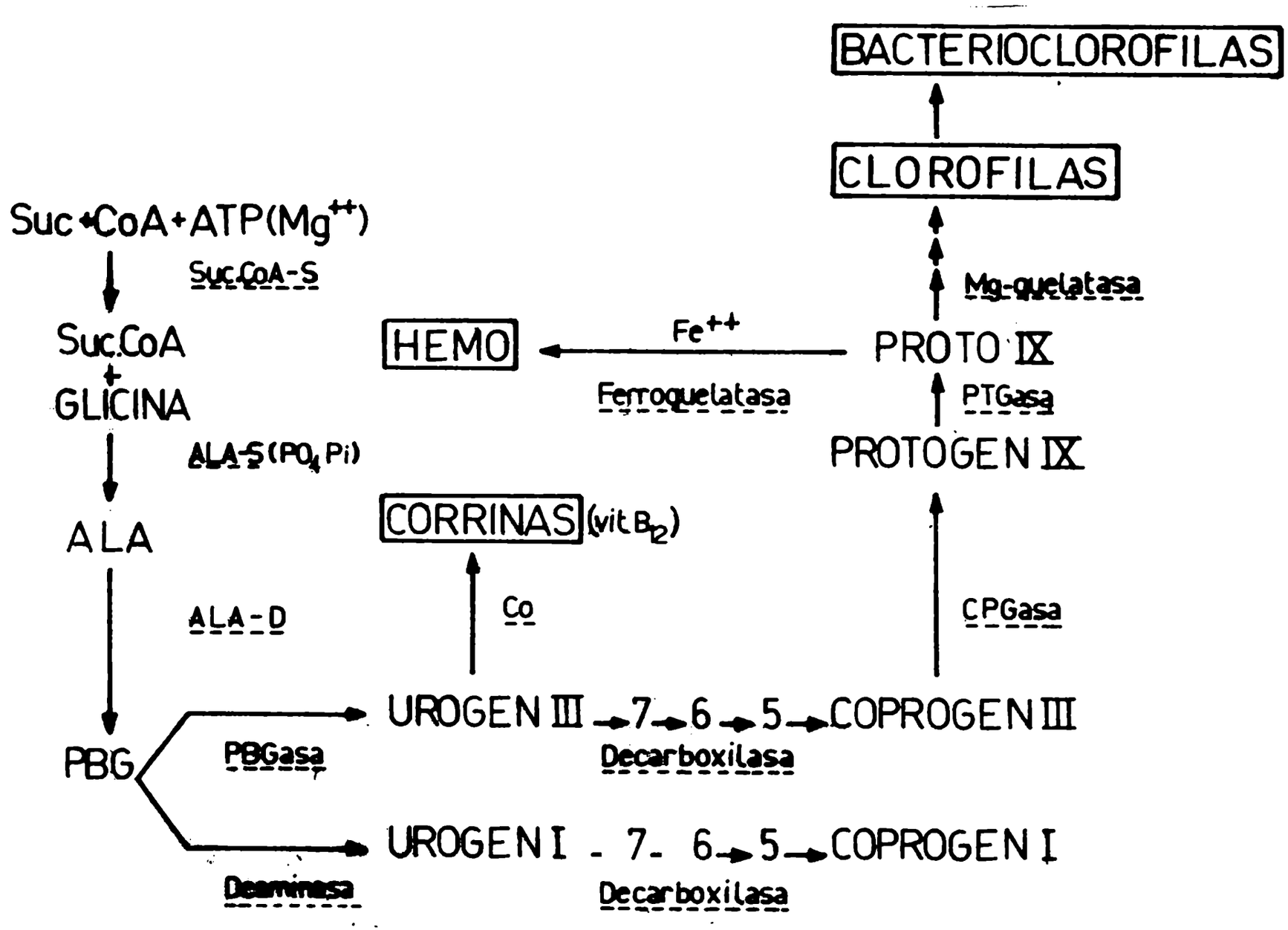


Figura 12: Diagrama de la Biosíntesis de Tetrapirroles

IV.2.- ORIGEN DE LOS ATOMOS DE CARBONO Y NITROGENO DE LOS TETRAPIRROLES NATURALES

Como acabamos de comentar, a pesar de que la compleja estructura de los tetrapirroles es difícil de sintetizar en el laboratorio, la mayoría de las células vivas son capaces de hacerlo fácilmente, a partir de muy simples constituyentes de la dieta. Con la introducción de las técnicas isotópicas, fue posible comprobar esta hipótesis. Así, con los clásicos estudios de Shemin y Rittenberg (1945), usando glicocola marcada con N^{15}, y midiendo la incorporación del isótopo en el Hemo formado, se demostró que la glicocola era el precursor de los 4 átomos de nitrógeno del Hemo (Figura 13).

Empleando la misma metodología se encontró que los 4 carbonos de los puentes meténicos provenían también del Carbono α de la glicocola, además de otros 4 de los carbonos α en los anillos pirrólicos (Radin, Rittenberg y Shemin, 1950).

Una clave fundamental acerca del origen de los 26 átomos de C restantes en la molécula de Protoporfirina IX provino también del laboratorio de Shemin, de las primeras observaciones de Bloch y Rittenberg (1945), acerca de que por administración a ratas, de acetato, éste se incorporaba al Hemo. Shemin y Rittenberg (1951) demostraron enseguida, que ambos átomos de C^{14} del acetato se incorporaban en la Protoporfirina.

Las consideraciones anteriores constituyeron entonces las claves para el estudio del mecanismo de formación de las porfirinas, muy pronto Shemin y colaboradores (1952, 1955) demostraron que el succinato o su forma activa, la Succinil CoA, eran el precursor directo de los 26 átomos de C remanentes de la Protoporfirina IX (Figura 2) (Rimington, 1957; 1958).

Estos hallazgos fueron de tal importancia y trascendencia en su momento y aún hasta el presente, que durante muchos años Shemin figuró entre la nómina de posibles laureados con el Premio Nobel de Química, sin embargo este reconocimiento nunca se concretó.

La identificación de estos precursores en el camino biosintético del Hemo y de sus conversiones enzimáticas provino de las escuelas de Rimington, Granick, Neuberger y el mismo Shemin.

IV.3.- EL PBG, UN INTERMEDIARIO EN LA BIOSINTESIS

A esta altura de los conocimientos de la biosíntesis de las porfirinas los estudios dieron un cambio de dirección brusco, o quizás sería mejor decir que adoptaron otro enfoque. De allí que la confirmación de que el PBG era un precursor directo del Hemo, haya sido previa a la determinación de que el ALA también lo era, y además se lograra por una vía diferente a la empleada con los otros precursores ya identificados. Por ello es también interesante dedicarle particular atención a esta otra etapa en el desarrollo de los eventos que contribuyeron al esclarecimiento del mecanismo de biosíntesis de las porfirinas.

Se había demostrado que la orina de pacientes con porfiria aguda intermitente contenía altas concentraciones de un compuesto que daba reacción de Ehrlich positiva (Sachs, 1931). En base a sus propiedades se le dió el nombre de 'Porfobilinógeno' (Walldenstron y Vahlquist, 1939). Después de varios intentos para aislarlo, recién en 1953, Cookson y Rimington consiguieron separarlo y determinar su estructura, confirmada por síntesis (Rimington y Krol, 1955).

Simultáneamente, Falk, Dresel y Rimington (1953) demostraron que el PBG era convertido en Uro, Copro y Protoporfirinas por hemolizados de glóbulos rojos de aves, indicando que era un precursor directo en este camino metabólico.

IV.4.- ALA, PRECURSOR DEL PBG

Una vez conocida la estructura del PBG, demostrado que podía formarse a partir de glicocola y succinato, y era un intermediario en la biosíntesis de porfirinas, fue posible especular acerca de las etapas existentes entre estos compuestos. Así, se postuló que por condensación de glicocola con succinil CoA, se formaba un compuesto inestable, el ácido α-amino-β-ceto adípico, que fácilmente se decarboxilaba a ácido δ-aminolevúlico (ALA), el verdadero precursor. Rápidamente se confirmó esta hipótesis (Dresel y Falk, 1953; Neuberger y Scott, 1953).

Posteriormente, empleando distintos tejidos, se aislaron y caracterizaron los sistemas enzimáticos involucrados en las distintas etapas que llevan de succinato y glicocola a ALA, PBG y porfirinas, aspecto que consideraremos ahora con mayor detalle.

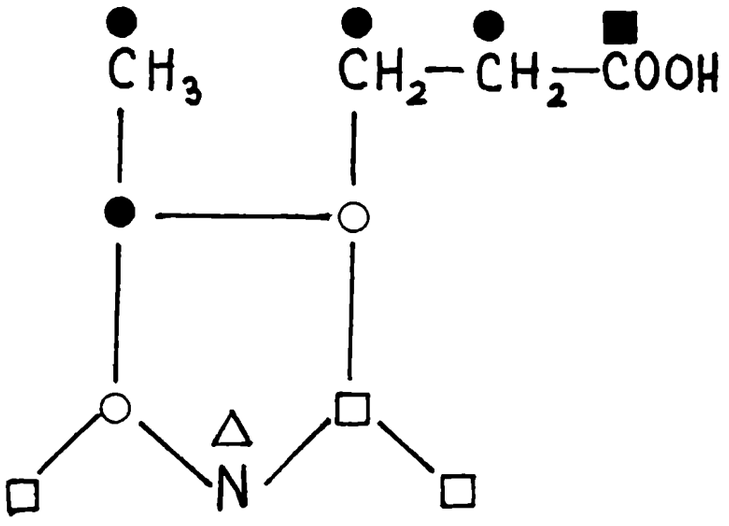


Figura 13: Origen de los átomos de carbono y nitrógeno de la molécula de Protoporfirina IX. Representación esquemática de un núcleo del anillo porfirínico. △ : nitrógeno de la glicina, ○ : grupo carboxilo del acetato, ■ : grupo carboxilo del acetato y carboxilo de la succinil CoA , ● : grupo metílico del acetato, □ : carbono metilénico de la glicina.

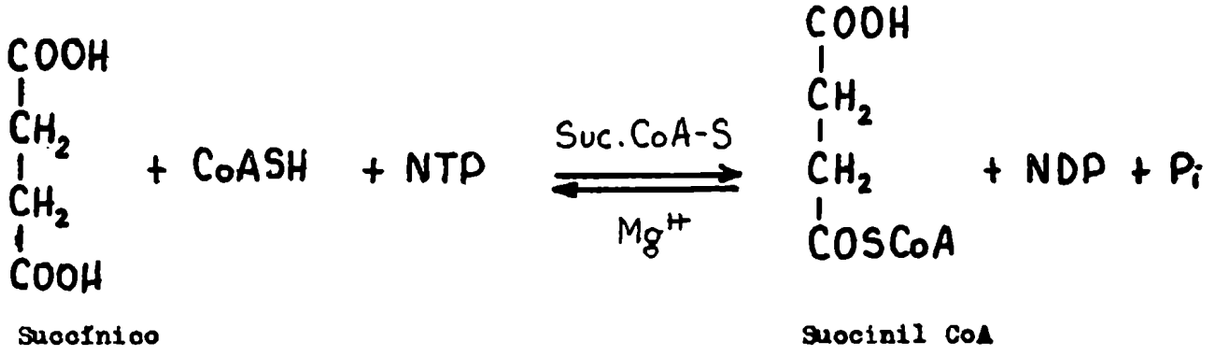


Figura 14: Síntesis de Succinil CoA catalizada por la Succinil CoA-Sintetasa

V.- LAS ENZIMAS DEL CAMINO DE LOS TETRAPIRROLES

V.1.- SUCCINIL COA SINTETASA

V.1.1.- Propiedades y mecanismo:

Existen numerosas evidencias experimentales que indican que la Succinil CoA Sintetasa (Suc.CoA-S) desempeña un importante rol en la biosíntesis de los tetrapirroles y su control (Wider de Xifra y Tigier, 1971; Batlle, Llambías, Wider de Xifra y Tigier, 1975).

La Suc.CoA-S, también conocida como Succinil CoA tioquinasa, cataliza reversiblemente la activación de un grupo carboxilo del ácido succínico, con la CoA, en presencia de un nucleósido trifosfato (NTP), que es un compuesto rico en energía, de acuerdo a la siguiente reacción (Figura 14).

Esta enzima fue descubierta por Kaufman en 1951, desde entonces ha sido detectada, aislada y purificada a partir de numerosas fuentes, como corazón de cerdo, riñón, hojas de espinaça, leguminosas, trigo y tabaco, mitocondrias de alcaucil, callos de soya y E.coli (Nishimura y Grinnel, 1972; Wider de Xifra y Batlle, 1973).

En la mayoría de los tejidos estudiados, se ha encontrado que es una enzima particulada, mitocondrial o cloroplástica. Es altamente específica para el succinato y la CoA, mientras que su especificidad por el nucleósido trifosfato varía con la fuente estudiada; pero en general, la Suc.CoA-S de mamíferos puede usar Gaunosina trifosfato (GTP) o Inosina trifosfato (ITP), en tanto que las bacterias y plantas emplean Adenosina trifosfato (ATP). También es interesante que la enzima requiere la presencia de un metal divalente Mg^{++} o Mn^{++}, para manifestar al máximo su actividad.

La Suc.CoA-S se comporta asimismo como una enzima sulfhidrílica, lo cual implica la existencia de restos sulfhidrilos o -SH en su centro activo; por esta razón es inhibida por reactivos típicos de grupos tioles, bloqueantes o de otra naturaleza, como el p-cloro mercuribenzoato (PCMB), iodoacetamida (IA), etc., y en algunos tejidos, es necesaria la presencia de un protector de -SH, como el Glutation reducido (GSH) para que la enzima sea activa (Wider de Xifra y Batlle, 1974).

El Peso Molecular de esta enzima varía según la fuente, entre 70.000 y 140.000. Mediante el empleo de agentes disociantes, se ha demostrado que está formada por dos tipos de subunidades, designadas como α y β, de Pesos Moleculares 29.000 y 41.000 respectivamente; de manera que en E. coli por ejemplo, la enzima es un tetrámero $\alpha_2 \beta_2$.

En cuanto al mecanismo de acción de la Suc.CoA-S, se han llevado a cabo numerosos trabajos, los cuales han conducido a la postulación de varios mecanismos, que sin embargo presentan algunas facetas comunes; así, todos ellos coinciden en que la primer etapa en la compleja secuencia de reacciones que finalmente producen Suc.CoA-S, es la fosforilación de la proteína enzimática, por medio del nucleósido trifosfato, rico en energía.

Uno de los esquemas más recientes, que tiene en cuenta todas las evidencias experimentales acumuladas hasta el presente, y que plantea la posibilidad de caminos alternativos, o aún, eventualmente, no enzimáticos, y considera además todos los otros mecanismos postulados, se ilustra en la Figura 15 . En este diagrama, se explican también la formación y detección de otros complejos, cuya existencia ha sido muy discutida, pero que sin embargo, no debemos descartar ante la posibilidad de que podrían resultar de una alteración de los equilibrios del camino normal, y consecuentemente de una desviación por esas vías laterales (Wider de Xifra y Batlle, 1976).

V.2.- ACIDO δ-AMINOLEVULICO SINTETASA

V.2.1.-Propiedades y mecanismo:

La formación de ALA a partir de glicocola y succinil CoA, es la primer etapa que conduce específicamente a la biosíntesis de porfirina, catalizada por la enzima δ-Aminolevúlico Sintetasa (ALA-S) (Figura 12).

Como veremos, esta enzima cuenta entre sus requerimientos a ciertos cofactores, como el fosfato de piridoxal y la CoA; estos hechos permitieron explicar luego, interesantes observaciones realizadas hace más de 40 años, acerca de que en ciertos casos de deficiencias nutricionales de piridoxina y pantotenato, se producía un tipo de anemia hipocrómica. Mucho tiempo después, se determinó que el sitio de acción de estas vitaminas, se localizaba a nivel de la etapa inicial de condensación de la glicocola con el succinato activo.

En la mayoría de los tejidos estudiados, el ALA-S se encuentra asociada a la fracción particulada, si bien en hígado de rata, se ha determinado recientemente, que la enzima se sintetiza en el citoplasma, como parte de un complejo con otras dos proteínas, cuya función aún se desconoce y se separan del ALA-S, cuando ésta se transporta a la mitocondria, que es donde exhibe su actividad catalítica (Ohashi y Kikuchi, 1977).

Estudiando los requerimientos del ALA-S, como anticipamos, se encontró que el fosfato de piridoxal es indispensable para el funcionamiento de la enzima. En cuanto a la especificidad por sustratos, es muy específica para la succinil CoA. También presenta las características de una enzima sulfhidrílica.

A pesar de su supuesta ubicuidad, el ALA-S ha sido encontrada en extractos libres de células de Rh spheroides, Rh rubrum, Rh palustris, eritrocitos de aves, hígados de cobayo, rata, en espinaca y extractos de callos de soya. Sin embargo, no ha podido detectarse en proplástidos y cloroplastos, como tampoco en la fracción mitrocondrial de plantas superiores. La primera detección en un sistema de origen vegetal fue reportada por Wider de Xifra, Batlle y Tigier (1971).

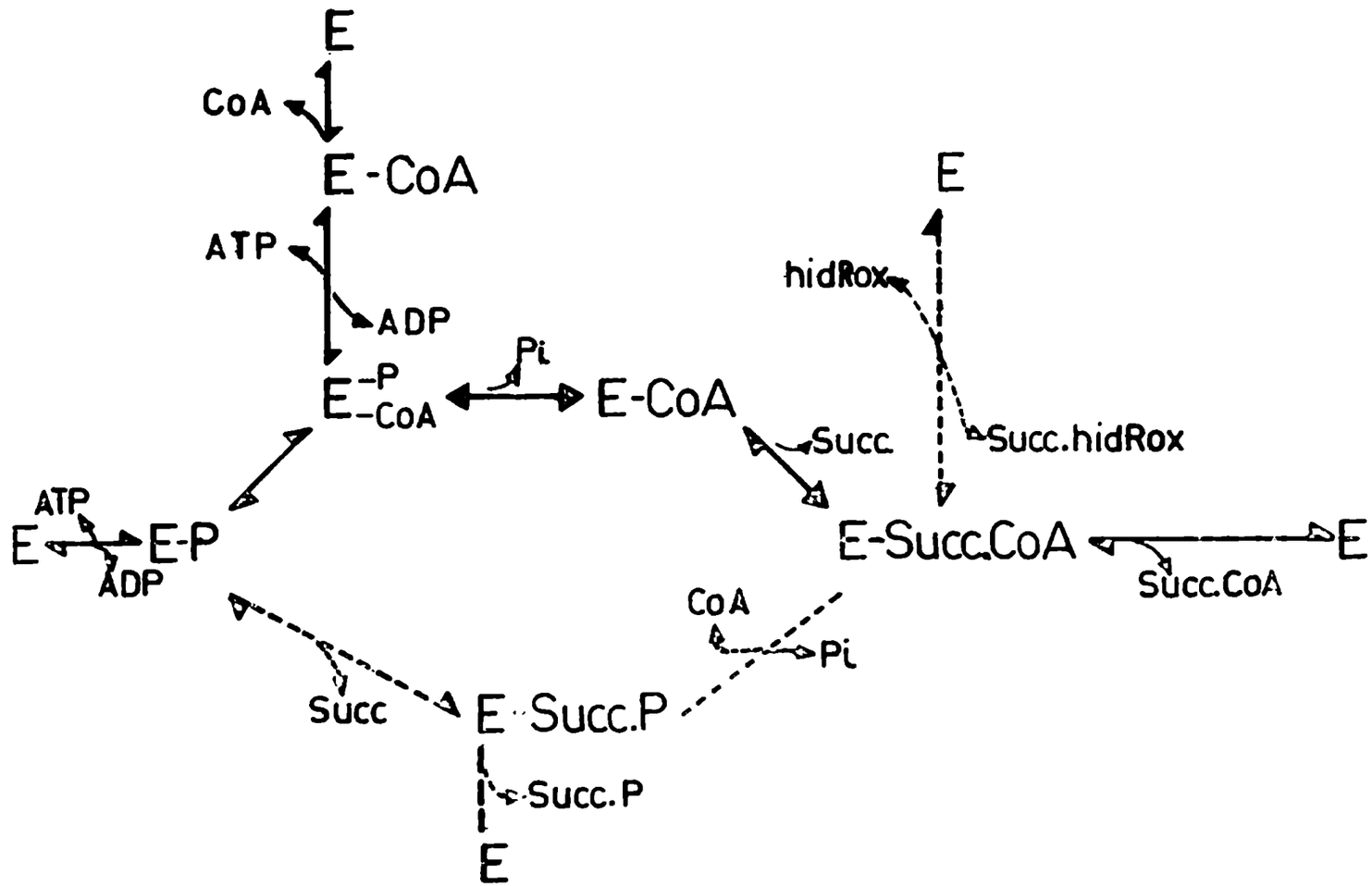


Figura 15: Mecanismo de acción de la Succinil CoA Sintetasa

En la mayoría de las fuentes empleadas, el ALA-S se caracteriza por su gran inestabilidad y corta vida media, lo cual hace dificultoso su estudio y purificación, y precisamente son muy pocos los casos en los cuales la enzima ha sido purificada, como asimismo difícil su detección en muchos sistemas. Teniendo en cuenta su carácter particulado y otras consideraciones como su gran labilidad una vez extraída de la célula, muchas de sus propiedades podrían explicarse, asumiendo que dentro de la célula, el ALA-S se encuentra asociada a las mitocondrias, de manera tal que este ensamble, le proporciona una infraestructura celular natural, la proteína pierde estabilidad y se inactiva más rápidamente. Esta hipótesis ha encontrado apoyo experimental, proporcionándole a la enzima, un soporte sólido y reconstituyendo artificialmente el ensamblamiento enzima-partícula, que se supone existe in vivo. En estas condiciones, como se esperaba, el ALA-S insolubilizada retuvo su actividad por largo tiempo, a diferencia de lo que sucedía con la enzima solubilizada (Wider de Xifra, Stella y Batlle, 1978).

En cuanto al mecanismo de acción del ALA-S se ha propuesto (Figura 16), que la glicocola se condensa con el fosfato de piridoxal, parte constituyente de la proteína inzimática, formando un carbanión estable que luego reacciona con el átomo de carbono del carbonilo electrofílico de la succinil CoA, para producir un intermediario muy inestable, el ácido α-amino β-ceto adípico, que aún unido a la enzima se decarboxila espontáneamente a ácido δ-aminolevúlico.

V.2.2.- Rol del ALA-S en el camino metabólico de las porfirinas:

Se acepta que el ALA-S es una de las enzimas claves en el camino metabólico del Hemo y se la considera la enzima limitante en la mayoría de los tejidos estudiados.

La excreción elevada de precursores ALA y PBG en las porfirias de tipo hepático agudas, ha llevado a investigar las causas o fallas congénitas, generadoreas de esta anomalía. Aunque más adelante hemos de tratar nuevamente este aspecto con mayor profundidad, es importante señalar aquí, que del estudio de modelos experimentales de Porfiria, en los cuales se induce una síntesis exacerbada de precursores y/o porfirinas, mediante la administración de ciertos compuestos llamados porfirinogénicos, ya sea a animales enteros o cultivos de células; se observó, que en todos los casos, la actividad del ALA-S estaba significativamente incrementada. Estos datos estaban indicando muy claramente, que sin lugar a dudas el ALA-S es la enzima limitante, que controla el camino de la biosíntesis de las porfirinas, y que cambios en su actividad son una de las causas principales de los disturbios bioquímicos que observamos en las Porfirias.

Es interesante también agregar aquí, que además de existir una gran gama de compuestos capaces de provocar un aumento de la actividad del ALA-S, se encontraron otros, como por ejemplo la Hemina, que por el contrario actúan inhibiendo la enzima. Estos dos efectos, son elementos fundamentales, dentro del mecanismo de regulación de la biosíntesis de porfirinas.

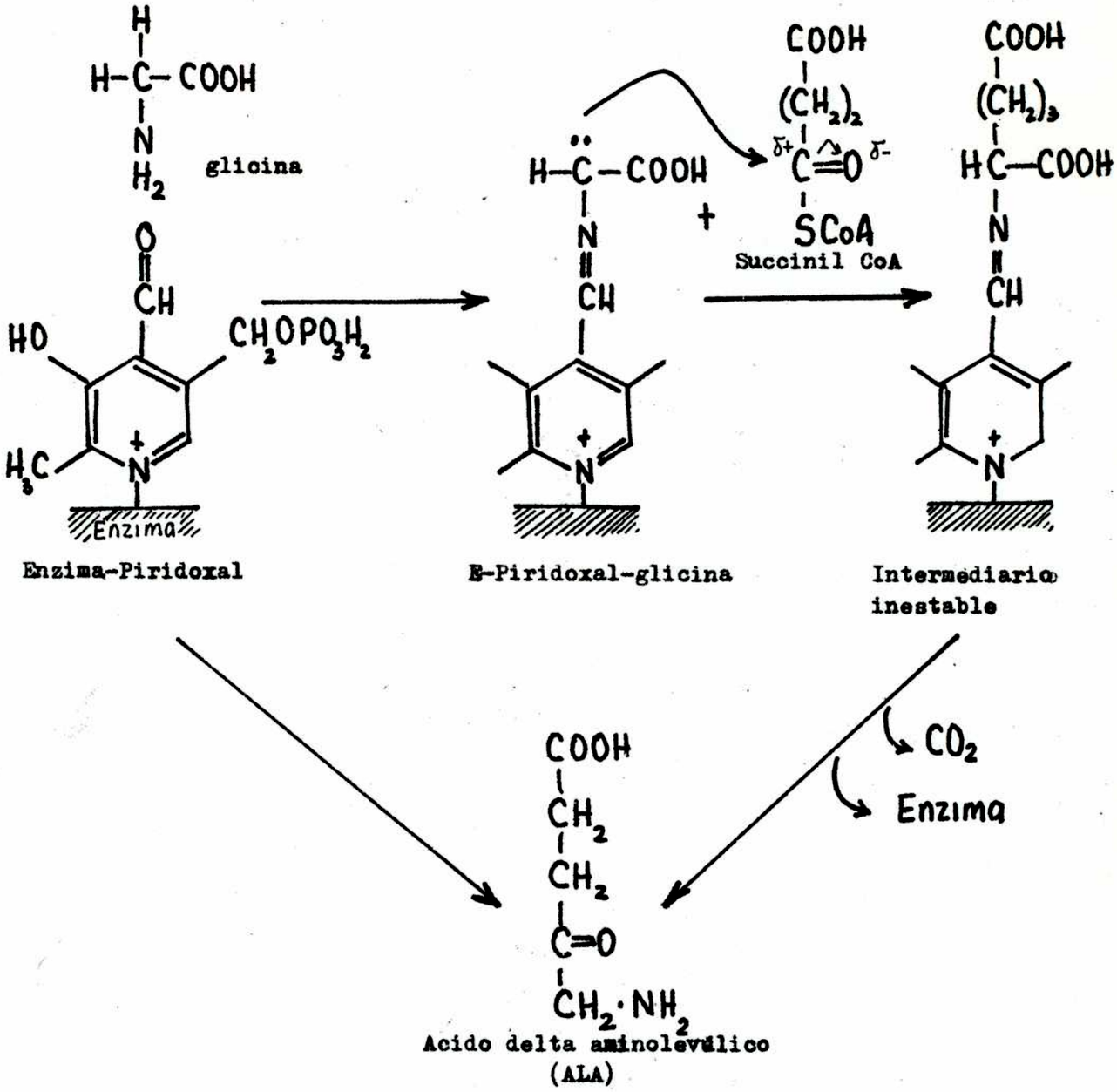


Figura 16: Mecanismo propuesto para la formación enzimática de ALA

V.3.- ACIDO δ AMINOLEVULICO DEHIDRASA

V.3.1.- Propiedades y mecanismo:

La ácido δ-aminolevúlico dehidrasa (ALA-D), cataliza la síntesis del primer intermediario aromático, el monopirrol Porfobilinógeno (PBG) a partir de dos moléculas de ALA (Figura 12).

Esta enzima ha sido detectada en una gran catidad de sistemas biológicos y se posee una muy amplia información acerca de ella. Ha sido aislada, purificada y caracterizada a partir de las fuentes más variadas dentro de la escala zoológica y del reino vegetal, y también se ha logrado cristalizar a partir de hígado bovino (Shemin, 1976).

En aquellos tejidos en los cuales también se ha detectado el ALA-S, la actividad del ALA-D es generalmente mucho mayor. A diferencia con el ALA-S, que vimos es particulada, el ALA-D es una enzima localizada en el citoplasma. Esto implica que en las células, el ALA debe salir de la mitocondria y pasar al citoplasma antes de poder convertirse en PBG.

En general se comporta como una enzima termoestable y típicamente sulfhidrílica, en la mayoría de los casos requiere la presencia de un activador tiólico para exhibir el máximo de actividad; estos activadores pueden ser compuestos tales como el GSH, cisteína, mercaptoetanol, tioglicolato, ditiotreitol. Lógicamente la inhiben agentes bloqueantes de grupos -SH, tales como el PCMB, IA y metales pesados, plomo, mercurio.

En muchos tejidos se ha comprobado además, que la actividad de la enzima depende de la presencia de ciertos cationes, postulándose que por ejemplo el Zn o el Cu forman parte de la estructura misma de la proteína enzimática, tratándose entonces de una metalo-enzima. En general, Zn^{++}, Mg^{++}, Al^{+++}, Mn^{++} a ciertas concentraciones producen la activación del ALA-D.

Hay asimismo evidencias de que en el centro activo de la enzima se encuentran, además de grupos -SH necesarios para la actividad, y un átomo de Zn por subunidad, 1 o 2 residuos lisina, 1 residuo histidina y restos de amino-ácidos hidrofóbicos, que en conjunto contribuyen a definir la estructura activa de la enzima.

Determinaciones del Peso Molecular del ALA-D proveniente de diversas fuentes, nos revelan que parece existir una forma o estructura bastante similar para las distintas especies, pues se ha obtenido, en la mayoría de los casos, el valor de 280.000. Mediante el empleo de agentes disociantes, se ha determinado que por ejemplo, el ALA-D de hígado bovino, es un oligómero formado por 8 subunidades muy similares, de Peso Molecular 35.000 (Shemin 1976).

Muy recientemente, mediante el empleo de las técnicas de insolubilización, se han obtenido resultados que permitirían postular que la estruc

tura mínima necesaria para la actividad catalítica, estaría constituída por un dímero funcional de dos subunidades similares, pero que cumplirían un rol diferente en la síntesis del PBG (Figura 17) (Batlle, Stella, Ferramola, Sopena, Wider de Xifra y Sancovich, 1978; Batlle y Stella, 1978).

En cuanto al mecanismo de acción del ALA-D, en 1968, Shemin y colaboradores (Nandi y Shemin, 1968), propusieron un esquema que, en principio aún tiene validez, sin embargo, en base a las experiencias experimentales obtenidas a posteriori, el esquema ha sido necesariamente modificado. En las Figura 17 se ilustra el mecanismo de reacción del ALA-D postulado más recientemente, a una década del anterior (Batlle y Stella, 1978).

V.3.2.- Rol del ALA-D en el metabolismo de las porfirinas:

Uno de los principales problemas que aquejan actualmente al hombre, es el de la contaminación ambiental, como consecuencia de ello, muchas son las enfermedades adquiridas, entre las cuales la Porfiria ocupa un lugar de importancia.

De los contaminantes ambientes tóxicos, ciertos metales como el plomo y el mercurio juegan un papel relevante.

La intoxicación crónica por plomo, conocida como plumbismo o saturnismo, provoca a nivel del metabolismo celular, una significativa inhibición de enzimas sulfhidrílicas; que se manifiesta con mayor sensibilidad sobre algunas etapas del camino del hemo. Una de las características bioquímicas de la intoxicación por plomo es una acumulación de ALA y Coproporfirina en orina y glóbulos rojos. Si bien el mecanismo real no está completamente dilucidado, se ha establecido, que en estos casos, se observa una inhibición significativa de la actividad del ALA-D, que puede llegar hasta un 80-90% en los estados más graves, proponiéndose que este efecto es debido a un bloqueo de los grupos -SH del sitio activo de la enzima, por el plomo. De manera, que la determinación de la actividad del ALA-D, se está tomando como un dato adicional de importancia para confirmar un diagnóstico de saturnismo (Chiselm, 1964).

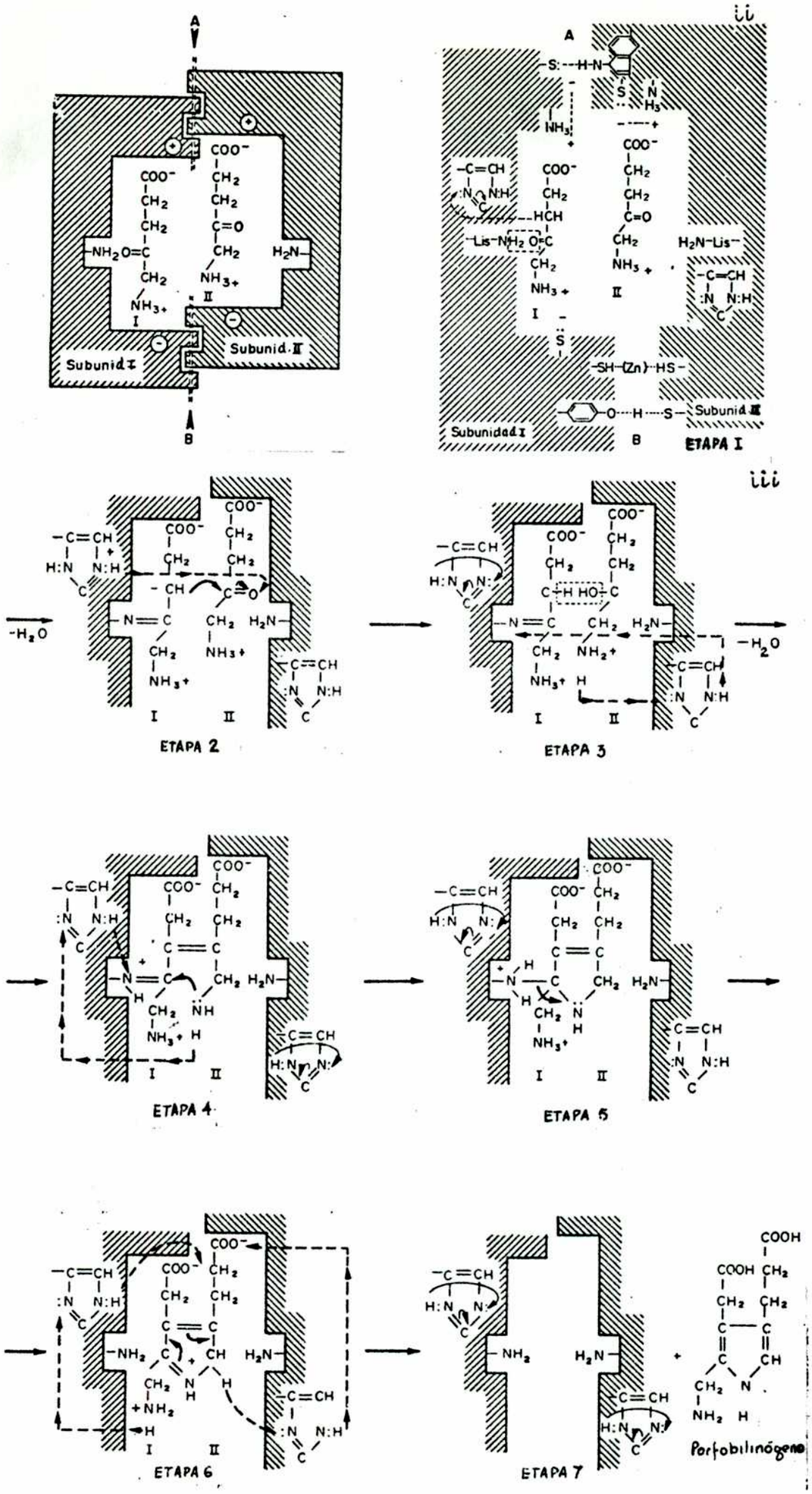


Figura 17: i) Estructura mínima funcional del ALA-Dehidrasa (Dímero)
ii) Esquema propuesto para la formación enzimática del PBG

V.4 PORFOBILINOGENASA

V.4.1- Introducción: Entre las diferentes etapas del camino de la biosíntesis de porfirinas, la formación del Uroporfirinógeno III a partir de cuatro moléculas del monopirrol PBG, es una de las más fascinantes, por cuanto la naturaleza ha desarrollado un sistema enzimático altamente específico, para catalizar un proceso único de reordenamiento que produce, curiosamente, el inesperado tipo isomérico III del Uroporfirinógeno. Y uno de los desafíos más atrayentes para los estudiosos del tema es precisamente la elucidación del mecanismo de acción de la Porfobilinogenasa (PBGasa). En 1957, Lockwood y Rimington designaron con el nombre de PBGasa al complejo enzimático que cataliza la ciclación de 4 unidades de PBG para dar lugar al Uroporfinirógeno III, como dijimos, el intermediario fisiológico en la biosíntesis del hemo, clorofilas y corrinas (Figura 12). La PBGasa es una combinación de por lo menos dos enzimas separadas, la Uroporfirinógeno I sintetasa o Deaminasa, una proteína termoestable y la Uroporfirinógeno III cosintetasa o Isomerasa, una proteína termo-lábil.

La Deaminasa, actuando sola, convierte 4 moléculas de PBG en una de Uroporfirinógeno I por medio de una repetida condensación cabeza-cola, con eliminación de amoníaco y finalmente cierre del anillo, si bien aún no está totalmente establecido si esta última ciclación es un proceso enzimático catalizado por la misma enzima, o si el tetrapirrol resultante se cicla espontáneamente.

Aún no se conoce con certeza cuál es el modo de acción de la Isomerasa, se sabe que la enzima aislada es incapaz de consumir PBG o de catalizar la conversión de un isómero del Uroporfininógeno en el otro, sin embargo, recordemos una vez más, que como resultado de la acción combinada de la Isomerasa y la Deaminasa, se modifica la orientación de uno de los anillos pirrólicos del PBG en el tetrapirrol y finalmente se produce el Uroporfirinógeno III. También se ha demostrado que la Isomerasa no afecta ni la velocidad ni la estequiometría de la reacción, pero su concentración relativa a la Deaminasa, en el complejo parecería determinar la proporción de Uroporfirinógeno III : I; así cuando la Isomerasa se encuentra en exceso, que es lo que ocurre normalmente en todos los organismos y tejidos, se forma exclusivamente Uroporfirinógeno III. Dijimos que cuando la Isomerasa está ausente, es decir por la sola acción de la Deaminasa, se forma Uroporfirinógeno I y finalmente, a concentraciones intermedias de Isomerasa, se biosintetizan mezclas de Uroporfirinógeno III y I, en las cuales, el porcentaje de isómero III es proporcional a la cantidad de Isomerasa presente.

Ya en 1963, Bogorad había postulado, aunque sobre bases teóricas, que la Isomerasa participaba actuando sobre un intermediario desconocido producto de la acción de la Deaminasa sobre el PBG (Figura 18).

Se han propuesto alrededor de 25 esquemas para explicar el mecanismo de acción de la PBGasa y la mayoría de estas hipótesis se han basado en la suposición de que durante la reacción se debían formar intermediarios polipirrólicos, tales como di, tri y tetrapirrilmetanos de cadena abierta; sin embargo

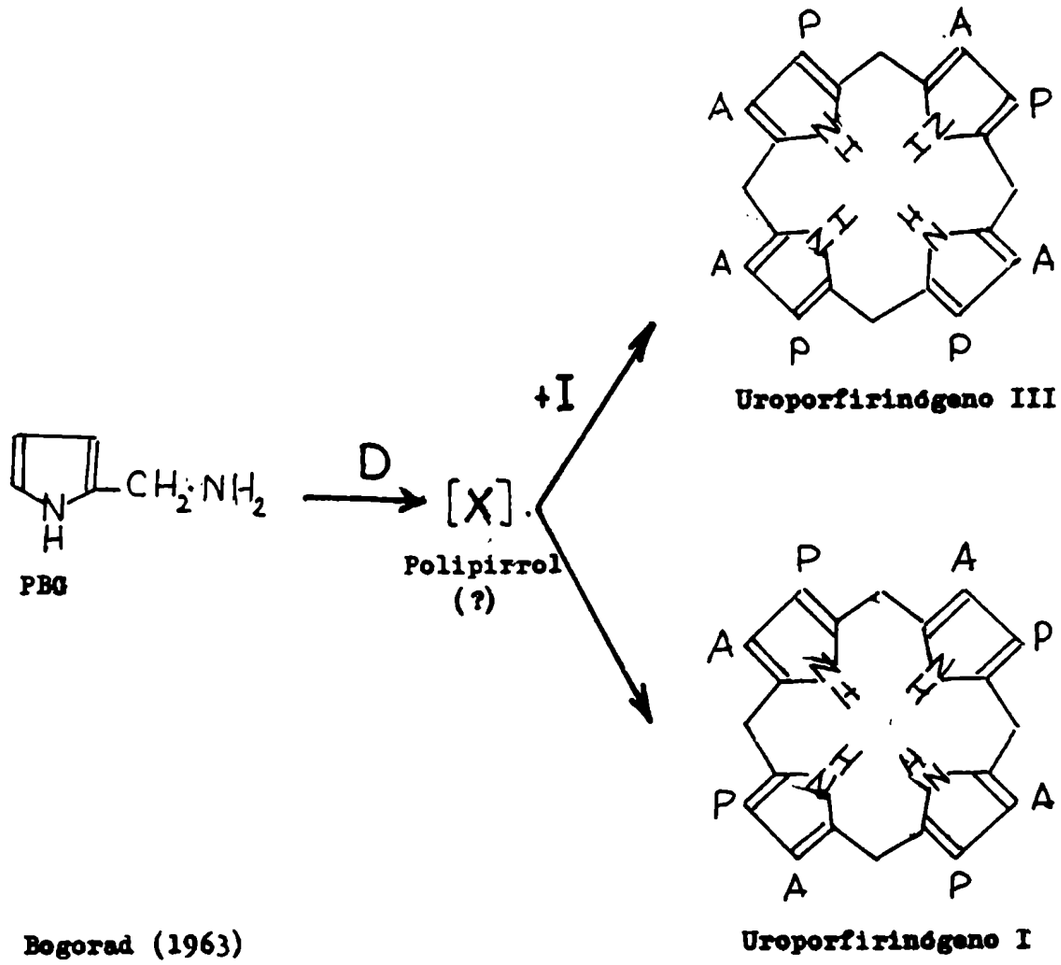


Figura 18: Intermediario polipirrólico (X), producto de la acción de la Deaminasa sobre el PBG, propuesto por Bogorad, como sustrato de la Isomerasa (I).

hasta nuestros estudios empleando las enzimas de callos de soya (Llambías and Batlle, 1970 a), ni siquiera se habían detectado alguno de estos supuestos intermediarios; y por otro lado, cuando diferentes dipirroles sintetizados químicamente se habían incubado con las enzimas, no se había obtenido conversión alguna a Uroporfirinógenos (Hoara and Heath, 1960).

Sin embargo, la teoría de Bogorad encontró cierto apoyo cuando, por primera vez, se demostró en nuestro laboratorio la existencia de dos intermediarios diferentes que se formaban en condiciones normales, cuando la PBGasa o la Deaminasa de callos de soya se incubaban con PBG (Llambías and Batlle, 1970 a, 1971 a). Cronológicamente es importante señalarlo, ésta fue la primera demostración experimental de la formación enzimática de intermediarios polipirrólicos a partir de PBG (Tabla III). Es también de interés notar, que esos intermediarios no se liberaban a la solución durante la incubación, separándoselos de las mezclas de reacción después de la precipitación de la enzima por acidificación.

Nueve meses después, el grupo de Bogorad (Pluscec and Bogorad, 1970) en una asombrosamente rápida publicación producida después de una Gordon Conference (julio 1970), en la cual nuestro trabajo ya aparecido a comienzos del año, encontrara un significativo apoyo, reportó el aislamiento de un dipirrilmetano formado enzimáticamente incubando Deaminasa y PBG en presencia de hidroxilamina, un conocido inhibidor de la formación de porfirinas. En 1972, Radner & Bogorad, siguiendo la misma línea de trabajo, pero empleando como inhibidor de la Deaminasa el amonio, aislan un tetrapirrilmetano. Un año más tarde, Davies and Neuberger, (1973), reportaron resultados prácticamente similares. De todas maneras, lo importante fué, que aquella primera demostración de la real existencia de intermediarios polipirrólicos, orientó y estimuló nuevamente la búsqueda de tales intermediarios, renovando el interés por el estudio del mecanismo de acción de esta intrigante etapa.

Paralelamente, hacia fines de 1971, estudios empleando dipirrilmetanos sintéticos produjeron una serie de importantes datos experimentales que han constituído un valioso aporte para la elucidación de la forma de acción de la PBGasa.

Este fascinante problema no es sólo de sumo interés desde un punto de vista puramente científico, sino también por su directa vinculación con las porfirias. Es indudable, como veremos más adelante, que cuanto más sepamos acerca del íntimo funcionamiento normal de este sistema enzimático, en mejores condiciones estaremos de explicar la naturaleza de los defectos enzimáticos primarios causantes de estas enfermedades.

V.4.2.-Propiedades generales de las enzimas

Tanto la PBGasa como sus componentes, Isomerasa y Deaminasa, se han aislado y purificado a partir de fuentes animales, vegetales y bacterianos y, en un gran número de casos, se han estudiado extensivamente sus propiedades,

Tabla III : Intermediarios Biosíntéticos

Llambías & Batlle

FEBS - Febr. 1970

y FEBS. Agosto 1970

Biochem.J.1971a

B. B. A. 1971b

Stella, Parera, Llambías & Batlle B.B.A. 1971

PBG + PBGasa → Intermediario Polipirrólico Normal (PAAPAP ...?) + PBG

- + I → U. III
- + D → U. III >> U. I
- + DI → U. III

PBG + D → Intermediario polipirrólico Anormal (PAPAPA ...?) + PBG

- + I → U. I >> U. III
- + D → U. I
- + D-I → U. I >> U. III

Pluscec & Bogorad

Biochemistry Nov. 1970

Radmer & Bogorad

Biochemistry 1972

PBG + D + NH_2OH (NH_4^+) → PAPA + PBG $\xrightarrow{D}$ U. I

PBG + D + NH_4^+ → PAPAPAPA

- $\xrightarrow{D}$ U. I
- $\xrightarrow{D-I}$ U. I

Davies & Neuberger

Biochem. J. 1973

PBG + D + $X.NH_2$ (HB) → PAPAPAPA $\xrightarrow[pH\ 7,5]{D}$ U. I

de manera que se cuenta con una abundante información acerca de estas enzimas, que vamos a recapitular brevemente.

Hasta ahora, en la mayoría de las células, la PBGasa parece ser una enzima citoplasmática, sin embargo, Bogorad (1955) dice haber detectado actividad de Deaminasa en cloroplastos de espinaca; mientras que Falk y Dresel (1960) han hallado evidencias de que la PBGasa podría estar asociada con la membrana externa de eritrocitos de aves; y Carell y Kahn (1964) demostraron que cloroplastos purificados y rotos de Euglena gracilis eran capaces de llevar a cabo síntesis de porfirinas a partir de ALA y PBG. Como veremos en este trabajo se han confirmado las observaciones de estos últimos autores, habiéndose detectado actividad de PBGasa tanto en fracciones particuladas como en sobrenadantes de E. gracilis, crecida bajo diferentes condiciones, apoyando la proposición original de Carell y Kahn (1964) de que los cloroplastos poseen automonía genética y contienen su propio mecanismo para la biosíntesis de porfirinas y clorofilas.

Los métodos empleados para la purificación del sistema enzimático, Deaminasa e Isomerasa, varían de tejido a tejido e involucran una serie de combinaciones más o menos complejas de procedimientos físico-químicos convencionales empleados comunmente en la purificación de proteínas.

Haciendo uso del hecho de que la Isomerasa es una proteína termo lábil en tanto que la Deaminasa no lo es, con frecuencia esta última se ha purificado por calentamiento del complejo, a tiempos variables según la fuente, a temperaturas superiores a 60 ºC (Llambías y Batlle, 1971b y referencias allí mencionadas). Sin embargo, en varios casos se ha logrado separar ambos componentes de la PBGasa sin destrucción o inactivación previa de ninguno de ellos, ya sea por diálisis contra agua destilada o fraccionamiento a través de resinas de intercambio iónico, o tratamientos con altas fuerzas iónicas (Levin y Coleman, 1967; Stevens et al, 1968; Sancovich et al, 1969a; Llambías y Batlle, 1971a, b).

Como se dijo más arriba, en la mayoría de los casos se han estudiado muchas de las propiedades de las enzimas purificadas.

En algunas oportunidades las preparaciones finales se comportaron electroforéticamente como proteínas homogéneas a diferentes valores de pH; sin embargo ésto dependía de la fuente empleada, así por ejemplo a pHs alcalinos, la fracción más pura de PBGasa obtenida de callos de soya, se resolvía en dos bandas, en tanto que la Deaminasa y la Isomerasa de igual origen migraban cada como banda única, coincidiendo la posición de la última con la banda más rápida del complejo, en tanto que la de la Deaminasa con la de la más lenta. (Figura 19). La PBGasa purificada de hígado bovino migraba como banda única, hasta la altura correspondiente a la Deaminasa de callos de soya, mientras que la PBGasa de eritrocitos de aves se resolvía en tres bandas, todas con una velocidad de migración menor que la Isomerasa de callos de soya. Sin embargo es de notar que la Deaminasa de callos de soya y la de eritrocitos mostraron, aparentemente, igual comportamiento cromatográfico.

En cuanto a su tamaño molecular, se ha observado que la fuerza iónica

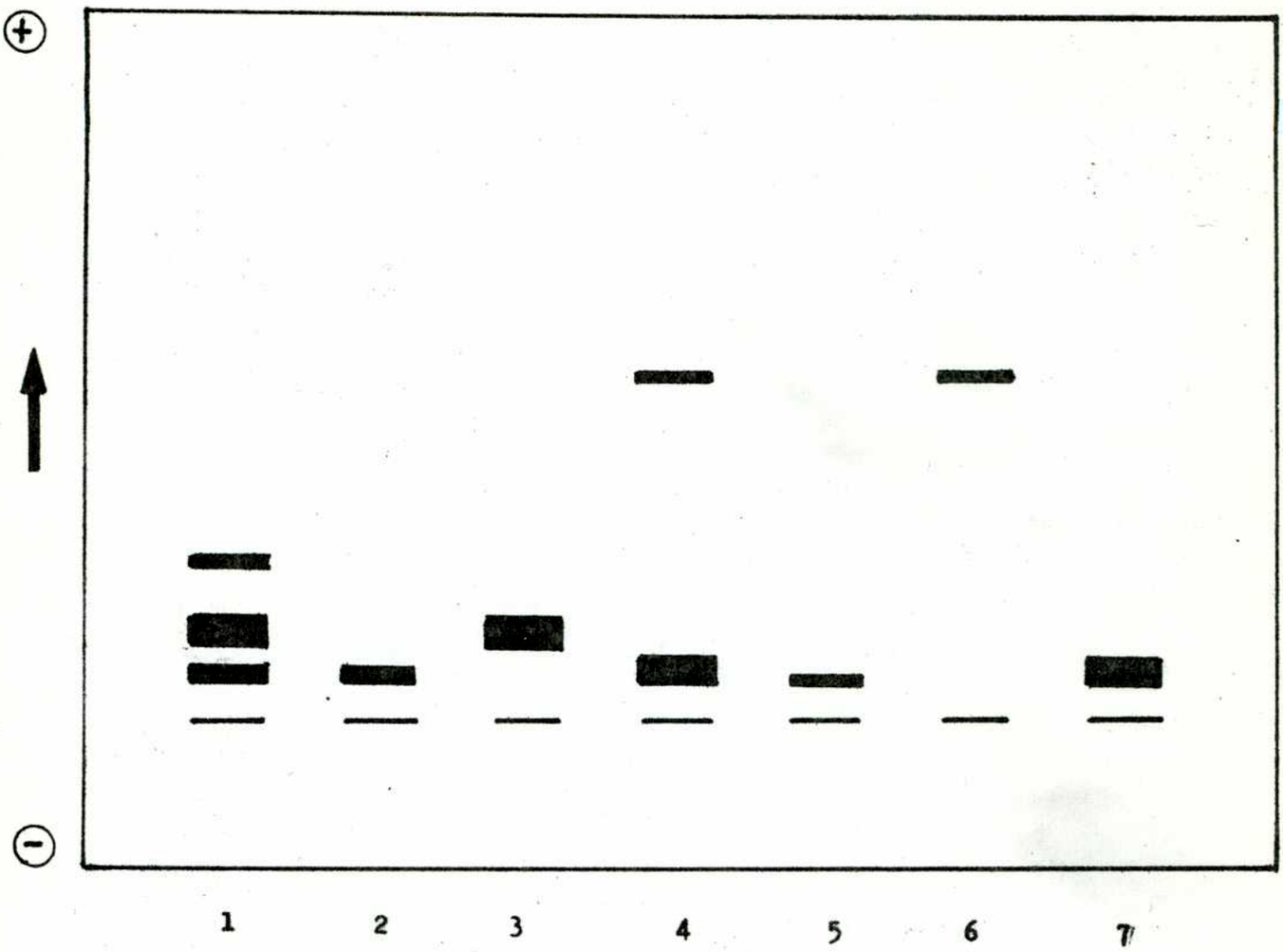


Figura 19: Comportamiento electroforético sobre gel de almidón de enzimas de eritrocitos de aves: 1) PBGasa purificada 4900 veces; 2) Deaminasa purificada 8550 veces y 3) Isomerasa en su mayor grado de purificación. Enzimas de callos de soya: 4) PBGasa purificada 70 veces, 5) Deaminasa purificada 140 veces y 6) Isomerasa en su mayor grado de purificación. Enzimas de hígado bovino: 7) PBGasa purificada 182 veces.

y la presencia de ciertos compuestos influencia significativamente el comportamiento de la Isomerasa en columnas de geles de dextrano y agarosa (Sancovich et al, 1969a; Llambías y Batlle, 1971a, b) sugiriendo que según las condiciones experimentales usadas, puede tener lugar la asociación de varias unidades de Isomerasa, originando diferentes agregados moleculares, lo cual explicaría el hecho de que se encuentren en la literatura valores de pesos moleculares distintos.

Por el contrario parece existir buen acuerdo en cuanto al Peso Molecular para la Deaminasa, esta enzima obtenida de variadas fuentes se presenta como una proteína de Peso Molecular 40.000 ± 4.000 (Llambías y Batlle 1971a, b; Jordán y Shemin, 1973; Sancovich et al, 1976; Higuchi y Bogorad, 1975) si bien hay un reporte de un Peso Molecular 25.000 ± 5.000 (Frydman y Feinstein, 1974), y se han encontrado algunas evidencias acerca de la posible disociación de la especie de 40.000 en subunidades de pesos moleculares menores.

Es evidente, de lo discutido anteriormente, que los pesos moleculares promedios determinados para la PBGasa, son diferentes, habiéndose sugerido que debe existir un fenómeno de asociación-disociación entre un número variable de unidades de los componentes individuales de este complejo enzimático (Llambías y Batlle, 1971a) y que en las preparaciones crudas de PBGasa, e in vivo, debe existir un exceso de Isomerasa con respecto a Deaminasa; es decir que en condiciones normales muy probablemente varias unidades de Isomerasa se encuentren combinadas, o por lo menos estén disponibles para combinarse con una unidad de Deaminasa para formar el complejo activo de la PBGasa, Este exceso de Isomerasa aseguraría la exclusiva formación del Uroporfirinógeno III y posiblemente actuaría modificando las propiedades del complejo, alterando su especificidad según fuera sugerido por Sancovich et al (1969a).

En nuestro laboratorio, se ha unido la PBGasa de hígado bovino a Sepharosa obteniéndose una preparación de la enzima insoluble capaz de sintetizar Uroporfirinógeno III. Sin embargo, la relación de Uroporfirinógeno III a I dependía tanto del tratamiento previo de la enzima como de las condiciones de incubación (Rossetti, Parera Batlle, 1976) y las cantidades relativas de Isomerasa y Deaminasa activas. (Rossetti, Parera y Batlle, 1976).

En general, se han observado actividades óptimas de PBGasa y Deaminasa a pHs entre 7,2 y 8,1, según la fuente enzimática de partida. Las formas de las curvas fueron las mismas para ambas enzimas tanto si la actividad se expresaba en función de la formación como en función de PBG consumido. Sin embargo, el comportamiento de las enzimas de callos de soya fue diferente (Llambías y Batlle, 1971a) si bien se observó un único y agudo pico de pH óptimo a 7,2 para la PBGasa y Deaminasa cuando la actividad se medía en términos de la cantidad de Uroporfirinógenos formados, cuando se la representaba midiendo la consumición de su sustrato, así apreciaban bien definidas a pH 6,7 y 7,2; sugiriéndose que probablemente el consumo de PBG ocurre en dos etapas que poseerían dos pH óptimos algo diferentes.

Es también interesante recordar aquí, las observaciones de Conford (1964), quién trabajando con un sistema más o menos crudo, capaz de producir una

mezcla de porfirinas de tipo I y III, encontró que las cantidades y concentraciones relativas de estos isómeros estaban influenciados significativamente por cambios de pH y composición salina. En ausencia de sales, en particular de ClNa, se obtenía un ancho pH óptimo entre 7,2 y 8,1 para la formación total de porfirinas, el cual se agudizaba a un pH de 7,8 por el agregado de ClNa 148 mM. También investigó el efecto de las sales de sodio sobre la proporción de las series III a I a diferentes pHs. encontrando que el Ph óptimo para la formación de la serie III era 8,1, en presencia o ausencia de ClNa. Por otro lado la concentración relativa de porfirinas de la serie I se incrementaba a bajos pHs en ausencia de sales de sodio y en ambos casos disminuyó por un aumento del pH, aunque su formación sólo pudo suprimirse a pH 8,7 en presencia de ClNa. Resultados en cierto modo análogos se obtuvieron empleando preparaciones parcialmente purificadas de PBGasa de hígado bovino (Sancovich, Ferramola y Batlle, resultados no publicados), pero en este caso al pH óptimo de 7,4 que correspondía a la máxima formación de porfirinas totales, la cantidad de Uroporfirinógeno III era sólo del 75%, aumentando al 100% hacia pHs más ácidos o más alcalinos, entre 6 y 9, a los cuales, sin embargo la síntesis total de porfirinas era lógicamente menor Cuando se utilizaba PBGasa altamente purificada, el pH óptimo seguía siendo 7,4, formándose en este caso 100% de Uroporfirinógenon III. En consecuencia, estos antecedentes estarían indicando que tanto al pH como la fuerza iónica del medio son factores muy importantes en cuanto a la forma de actuar de la PBGasa, afectando muy probablemente la formación de un complejo activo Deaminasa-Isomerasa (Sancovich et al, 1969a).

Hasta el presente, en todos los sistemas estudiados, la PBGasa y la Deaminasa se comportan como enzimas sulfhidrílicas (Sancovich et al 1969a; 1976; Llambías y Batlle, 1971a, b; Frydman y Feinstein, 1974). Si bien las evidencias experimentales sugieren la existencia de grupos SH, aún no está bien claro cuál sería el mecanismo por medio del cual participarían en la reacción; se ha propuesto que podrían tal vez estabilizar al complejo enzima-sustrato o que quizás podrían ser indispensables para la formación de un complejo enzimático activo, confiriéndole al mismo el ordenamiento o disposición estructural necesaria para la expresión de su actividad (Llambías y Batlle, 1971a, b). Los típicos inhibidores de grupos tioles afectan en un grado diferente la formación de porfirinas y el consumo de PBG, en general inhiben más la primera, lo cual podría deberse a que restos SH se encuentren, de alguna manera, involucrados en la etapa de ciclación.

También se han encontrado evidencias de que grupos ditioles serían esenciales para la actividad enzimática. Por otro lado, varios reactivos, conocidos clivantes de uniones disulfuro, inhiben parcialmente la reacción (Llambías y Batlle, 1971b; Sancovich et al, 1976); en tanto que el cianuro, si bien no disminuyó la cantidad total de porfirinas formadas, formó un 80% de Uroporfirinógeno I en lugar de Uroporfirinógeno III, como si este reactivo interfiriera o compitiera de algún modo con el o los sustratos de la Isomerasa o bien estuvie-

ra bloqueando la acción de esta enzima (Lockwood y Benson, 1969; Llambías y Batlle 1971b).

El efecto de los iones amonio e hidroxilamina sobre la Deaminasa ya fue descripto por Bogorad en 1962 y 1963, quién encontró que estos reactivos inhibían el consumo de PBG pero en grado mucho menor que la formación de porfirinas. Más tarde, en nuestro laboratorio se halló que ese fenómeno era reproducible con la PBGasa y Deaminasa de hígado bovino, en cuyo caso el amonio actuaba inhibiendo competitivamente a la Isomerasa y no competitivamente a la Deaminasa (Sancovich et el 1969a, b); el mismo efecto inhibitorio se observó con las enzimas de otras fuentes (Llambías y Batlle 1971a, b; Frydman y Feinstein, 1974). Nosotros adelantamos la propuesta de que los iones amonio podrían inhibir la actividad de la Isomerasa, uniéndose al mismo sitio que el PBG sobre esta enzima, o probablemente a un sitio diferente del correspondiente al PBG, que podría ser el del intermediario polipirrólico, o aún más, que los iones amonio podrían producir una disociación del complejo Isomerasa-Deaminasa o interferir con su interacción, necesaria para la manifestación de su actividad (Sancovich et al, 1969a; Stella et al, 1971).

En algunos tejidos (Llambías y Batlle, 1971b), la adenina, ATP y ADP también inhibieron la enzima sin modificar el tipo isómerico formado; sin embargo con enzimas de otras fuentes, los efectos de estos compuestos fueron algo diferentes, y más complejos (Llambías y Batlle 1971a; Sancovich et al 1976).

Sancovich et al (1976) también encontraron que un gran número de alquil-aminas, y a ciertas concentraciones el ATP y el ADP, en presencia o ausencia de sales inhibían estas enzimas, mientras que a otras concentraciones los nucleosido di y trifosfatos producían activación.

Estos resultados nos sugirieron que dichos compuestos básicos tendrían efectos separados sobre la Deaminasa y la Isomerasa, y nos llevaron a postular que existía una competencia entre las enzimas y las bases por sus sustratos o intermediarios. Además, el hecho de que el efecto inhibitorio fuera mayor sobre la capacidad de formación de porfirinas que sobre el consumo de sustrato, nuevamente reforzaría la proposición anterior de que si la reacción enzimática involucra una etapa de polimerización y una de ciclación, esta última sería la más sensible a la acción de algunos inhibidores, entre los cuales estarían ubicados estos derivados básicos.

La acción estimulante de las sales de sodio y magnesio, a ciertas concentraciones, (Llambías y Batlle 1971a; Sancovich et al, 1976) podría explicarse suponiendo que estos iones participarían en algún fenómeno de asociación-disociación, que finalmente conferiría al complejo enzimático el ordenamiento extructural definitivo y necesario para una máxima actividad.

Es bien conocida la estabilidad al calentamiento de la Deaminasa. En la mayoría de los casos, en las primeras etapas de su purificación, esta enzima

puede incubarse durante 15-30 minutos a 65 ºC sin que ocurra pérdida de actividad, si bien a temperaturas superiores a ésta, la inactivación es bastante rápida . Por otro lado es de notar que las preparaciones más purificadas de Deaminasa son mucho más susceptibles a tratamientos a temperaturas elevadas.

Es interesante que cuando se somete a un precalentamiento a 60ºC durante 30 minutos a fracciones de PBGasa parcialmente purificadas, no sólo tiene lugar la esperada inactivación de la Isomerasa, sino que concomitantemente se observa un aumento de la biosíntesis total de porfirinas por incubación con su sustrato (Conford, 1964; Sancovich et al 1969a, Llambías y Batlle 1971a, b).

Asimismo se ha demostrado, que las Deaminasas de diversas fuentes eran fotosensibles (Frydman y Frydman, 1970; Frydman y Feinstein, 1974) e inhibidas por una pirroloxigenasa, una oxidasa de función mixta que inactiva enzimas conteniendo residuos triptofano, en presencia de ditionito, sugeriéndose entonces que este aminoácido podría estar involucrado de alguna manera en el sitio activo de la Deaminasa (Frydman y Frydman, 1973).

Ya hemos discutido, refiriéndonos en conjunto a la PBGasa y Deaminasa, cuál era el efecto de los reactivos característicos de grupos tioles y de diferentes compuestos básicos sobre la actividad de la última enzima.

En nuestro laboratorio (Llambías y Batlle, 1971a, b; Sancovich et al, 1976) se ha encontrado, que la actividad de la Deaminasa está disminuida también en presencia de algunos ácidos dicarboxílicos y 2-metoxi-5-nitrotropona, este último un conocido reactivo para la modificación química específica de grupos amino libres de proteínas. Se propuso, que los ácidos dicarboxílicos podrían inhibir la Deaminasa compitiendo con el PBG por algunos grupos de la enzima cargados positivamente, quizás los restos ε-amino de lisina o aún restos guanidino de arginina. Esta hipótesis encontraría apoyo previo en los trabajos de Bogorad (1958a) que demostró que el formaldehido, compuesto que reacciona fácilmente con los residuos lisina de las proteínas, inhibe la Deaminasa. Y, más recientemente, Pollack y Russell (1978), estudiando el efecto de la butanodiona, sobre la actividad de la Deaminasa de germen de trigo, encontraron que este reactivo inhibe significativamente a la enzima, y que el PBG, puede revertir dicha inhibición. La butanodiona es un reactivo que en ciertas condiciones inactiva varias enzimas por bloqueo de los grupos guanidino de residuos de arginina, que a su vez juegan un papel importante en el sitio activo de esas enzimas, cuyos sustratos contienen en su estructura grupos carboxilatos o fosfatos. Es muy probable que la Deaminasa, perteneciera también a esta familia de enzimas, sugiriéndose entonces que uno o más residuos arginina serían necesarios para la unión de su sustrato PBG.

En cuanto a la existencia misma y propiedades de la Isomerasa han sido en realidad por mucho tiempo en su mayor parte indirectas, y basadas en su inactivación por el calor; hasta que finalmente se logró separarla de la Deaminasa y

purificarla a partir de diferentes fuentes. Sin embargo, aún no se pueden llevar a cabo medidas directas de la actividad de la Isomerasa por cuanto no se conoce con certeza cuál o cuáles son los sustratos reales de esta enzima y para poder estimar su actividad es necesaria la presencia simultánea de la Deaminasa; sin embargo, en nuestro laboratorio, (Llambías y Batlle 1970a), empleando como sustratos conjuntamente al PBG y a ciertos intermediarios polipirrólicos producidos por las enzimas de callos de soya aislados e incubados con Isomerasa purificada de varias fuentes, se obtuvo formación de Uroporfirinógenos, sugiriéndose entonces, que probablemente los sustratos de la Isomerasa, sean el PBG y algún polipirrilmetano generado durante la reacción, si bien este último, en condiciones normales no se liberaría a la solución.

Como ya se ha mencionado, la Isomerasa es una proteína termolábil y pierde el 80% de su actividad cuando se pre-incuba por 20-30 minutos a 65-70º C. en presencia de la Deaminasa; la inactivación por calor es mucho mayor y ocurre a menores intervalos de tiempo cuando la Isomerasa se calienta sola, sugiriéndose que en el complejo de la PBGasa, la Isomerasa debe estar asociada a la Deaminasa en forma tal que esta última le confiere cierta protección al componente termo-lábil. El agregado de sulfato de amonio 0,01 M o PBG (0,04 mM), produce un 80-100% de protección frente a la inactivación térmica de la Isomerasa (Llambías y Batlle, 1971a, b; Sancovich et al, 1976). Se ha propuesto que la Isomerasa, se uniría a los grupos aminometilos del PBG o del intermediario polipirrólico, o a ambos, y así, cuando estuviera presente cualquier amino-derivado, éste podría quizás unirse a la Isomerasa a través del mismo sitio, contribuyendo a la estabilización y protección de la enzima.

Levin (1968b) observó que la Isomerasa no altera ni la estequiometría ni la velocidad de la conversión de PBG en Uroporfirinógenos, catalizada por la Deaminasa, y que el porcentaje de Uroporfirinógeno III formado, cuando Deaminasa y PBG no son limitantes, era directamente proporcional a la cantidad de Isomerasa agregada. Este mismo autor encontró que durante la reacción, la Isomerasa se inactivaba y que esa inactivación dependía de la presencia de PBG y de Deaminasa. Asimismo, la cantidad total de Uroporfirinógeno III formado era proporcional a la cantidad de Isomerasa que se consumía. De allí que Levin propusiera, que la Isomerasa misma, participa más estequiométricamente que catalíticamente en la formación del Uroporfirinógeno III, o bien que se inactiva estequiométricamente por acción de algun intermediario o producto de la reacción. Una hipótesis atrayente la de Levin, pero que sin embargo, aún no cuenta con mayores evidencias experimentales que la apoyen con más firmeza y no es tan fácil de adaptarla a una situación in vivo.

Ya comentamos que según las condiciones experimentales la Isomerasa puede formar agregados que darían lugar a especies de diferentes Pesos Moleculares, (Llambías y Batlle 1971a, b). También es evidente que en un determinado momento durante la síntesis del Uroporfirinógeno III, la Isomerasa debe

asociarse a la Deaminasa, para formar el complejo activo de la PBGasa; sin embargo aún no se cuenta con suficientes evidencias acerca de la afinidad de esta interacción, ni de la vida media del complejo, ni de las condiciones necesarias para su formación. A este respecto, existen datos de nuestro laboratorio (no publicados), que apoyan la existencia de una interacción específica y definida entre ambas enzimas; asimismo Higuchi y Bogorad (1975) habrían demostrado, si bien no muy claramente, que la Isomerasa de germen de trigo, formaría un complejo activo con la Deaminasa de hojas de espinaca en presencia del sustrato PBG; en tanto que Frydman y Feinstein (1974), sugieren que las enzimas de eritrocitos podrían formar un complejo similar pero en ausencia del sustrato.

Es aceptable que la condensación enzimática del PBG en Uroporfirinógenos debe ser ciertamente un proceso anaeróbico (Llambías y Batlle 1971a y referencias allí incluidas), pero en muchos casos, se ha demostrado que tanto la PBGasa, como la Deaminasa, son igualmente activas en ausencia de oxígeno como en su presencia (Bogorad 1958a, b; Lockwood y Benson, 1960; Sancovich et al, 1969a; Llambías y Batlle, 1971b); sin embargo se ha encontrado, que en callos de soya, la actividad de estas enzimas se afecta significativamente por la presencia de oxígeno (Llambías y Batlle, 1970a; Stella et al, 1971). En estos tejidos, la formación de Uroporfirinógenos sólo tenía lugar y su rendimiento era máximo bajo condiciones estrictamente anaeróbicas si bien, es notable, que el consumo de sustrato no se modificaba sensiblemente por el aire. Estos resultados llevaron a postular que la presencia de aire no prevendría la síntesis de intermediarios, pero que el oxígeno podría oxidarlos, y como tales no podrían ser ya utilizados por las enzimas.

Alternativamente, también se propuso (Stella et al, 1971), que el oxígeno podría actuar modificando a la enzima misma, por oxidación de alguno de sus grupos reactivos esenciales, tales como los tioles, bloqueando así la formación de intermediarios normales, o su ciclización final o eventualmente la interacción entre ambos componentes del complejo enzimático. Aunque aparentemente el consumo de PBG no parecería ser modificado por el aire, lo cual haría estas últimas hipótesis menos posibles; también es factible, que bajo condiciones aeróbicas, el PBG fuera consumido por otra vía que no llevara a la formación de porfirinas, como por ejemplo a través de una pirrol oxigenasa (Frydman et al, 1972a); de donde, todavía habría lugar a la consideración de estas alternativas, pera explicar el efecto diferencial del oxígeno sobre la actividad de estas enzimas.

3.-Estudios cinéticos

Los estudios más profundos y extensivos sobre las propiedades cinéticas de la PBGasa y Deaminasa se han llevado con las enzimas purificadas de hígado bovino (Sancovich et al, 1969b); eritrocitos de aves (Llambías et al,

1971b) y callos de soya (Llambías y Batlle, 1970c).

Estudiando la cinética de las enzimas de hígado bovino bajo muy variadas condiciones experimentales, se observó que en el caso de la PBGasa, los perfiles de velocidad de formación de Uroporfirinógeno III en función de la concentración de sustrato eran sigmoideos a todas las concentraciones de enzima empleadas, en tanto que los gráficos de las recíprocas resultaron lógicamente no-lineales, con un coeficiente de Hill n tendiendo a 2, en el caso de incubaciones normales, es decir en ausencia de agregados, tales como por ejemplo iones amonio.

En cuanto a la Deaminasa, tanto los gráficos de las directas como de las recíprocas, en ausencia o en presencia de iones amonio, respondían a una clásica cinética de Michaelis-Menten, con un n prácticamente de 1 (Figura 20). En consecuencia, teniendo en cuenta que en la reacción catalizada por la Deaminasa, no se observaron efectos cooperativos, en tanto que sí se manifestaban cuando actuaba la PBGasa, se postuló que dichos efectos facilitaban la unión del PBG al componente Isomerasa del complejo.

Sin embargo, cuando la PBGasa se calentaba o se dializaba contra agua destilada o cuando se agregaban iones amonio a la mezcla de reacción, la forma de la curva de saturación de sustrato cambiaba de sigmoidea a hiperbólica (Figura 20), desapareciendo entonces el fenómeno de interacción homotrónica, al mismo tiempo que tuvo lugar un incremento en la afinidad por el PBG y se formó Uroporfirinógeno I en lugar de Uroporfirinógeno III.

Los iones amonio inhibieron la Deaminasa no competitivamente, mientras que el tipo de inhibición de estos mismos iones sobre la Isomerasa fue del tipo competitivo.

De acuerdo a estos datos se propuso que, por lo menos en hígado, el mecanismo de acción de la PBGasa correspondería al de una enzima alostérica.

Como ya se ha mencionado, se estudió el efecto de una gran variedad de compuestos sobre el comportamiento de las enzimas de hígado bovino, (Sancovich et al, 1969a, b; 1976) y los resultados obtenidos están de acuerdo con la propuesta anterior, de que la PBGasa debe ser una proteína alostérica, que posee dos sitios de unión para sus sustrato por molécula de enzima activa.

Empleando eritrocitos de aves, Lockwood y Benson (1960) no pudieron encontrar evidencias acerca de la presencia de dos componentes proteicos distintos en la PBGasa, por lo cual, en aquel momento propusieron que en ese tejido no existía una Deaminasa como enzima independiente; al mismo tiempo, la cinética del complejo parecía ser del tipo michaeliano, por los menos a las concentraciones de sustrato ensayadas. Sin embargo alrededor de 10 años más tarde, en nuestro laboratorio (Llambías y Batlle, 1971b), partiendo de la misma fuente, se logró purificar la PBGasa y separarla en sus componentes Dea

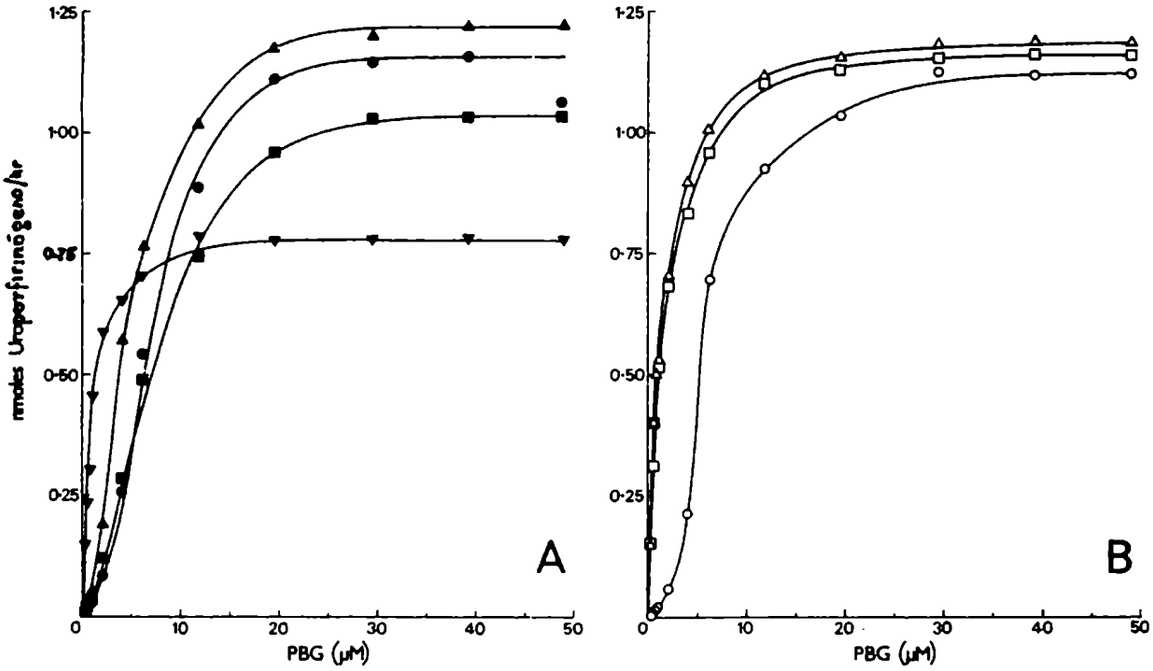


Figura 20: Efectos de la concentración de PBG sobre la actividad de la PBGasa bovina. **A** : a diferentes concentraciones de NH_4^+ (▼) = 0,1 M ; (■) 0,01 M; (●) 0,001 M; (▲) 0,0001 M. **B** : (○) sin agregado alguno (control); (□) la enzima se calentó durante 20 minutos a 65-70° (para destruir la Deaminasa); (△) la enzima se dializó contra agua destilada.

minasa e Isomerasa.

Por otro lado, estudiando la cinética de las enzimas de eritrocitos de aves y de callos de soya, en presencia y ausencia de diferentes iones, se encontró que las primeras exhibían un comportamiento similar al de las enzimas de hígado bovino; pero algo diferente al de las de callos de soya, que como veremos era bastante peculiar. Así, la cinética de la PBGasa, en función del consumo de sustrato, también mostraba una dependencia sigmoidea con la concentración de PBG, en ausencia de iones modificadores, y los valores de n eran cercanos a 2. Cuando había iones presentes, o cuando la Isomerasa estaba ausente, o inactivada, nuevamente desaparecían los efectos cooperativos homotrópicos.

La respuesta sigmoidea de la PBGasa de hígado bovino y de eritrocitos de aves, llevó a clasificar a esta enzima, como una proteína alósterica, indicando en consecuencia que la PBGasa estaría muy bien adaptada para la regulación por su propio sustrato.

Los extensos estudios cinéticos llevados a cabo con las enzimas de callos de soya, revelaron sin lugar a dudas, que estas enzimas presentaban un comportamiento cinético bastante diferente al de las mismas provenientes de otras fuentes, pero todavía consistente con la hipótesis de que la PBGasa debería poseer por lo menos dos sitios activos interactuantes, si bien no habría que descartar la posibilidad de la existencia de más de dos sitios.

Los datos obtenidos para la cinética de las enzimas de callos de soya, demostraron que éstas presentaban muchas de las características de una cooperatividad negativa.

Se observó que las curvas de saturación tanto de la PBGasa como de la Deaminasa, en presencia o en ausencia de iones amonio eran muy similares y poco comunes (Figura 21), las dobles recíprocas no eran lineales y además mostraban bimodalidad (Figura 22). Estos hallazgos, nos sugirieron la ocurrencia de dos reacciones, saturándose una de ellas a bajas concentraciones de PBG, en tanto que la segunda, a más altas concentraciones del mismo sustrato. Es decir se determinaron claramente dos Km para la reacción de la PBGasa, y de la Deaminasa.

También se determinó que los iones amonio actuaban inhibiendo competitivamente la primera etapa de la reacción de la PBGasa.

Es interesante añadir, que se observó el mismo tipo de perfiles cinéticos y valores de Km, tanto si la velocidad de reacción se expresaba en función de la formación de Uroporfirinógenos, como en función del consumo de PBG.

Esa desviación de un clásico comportamiento Michaeliano, o aún de uno sigmoideo, se apreció también al calcular los valores de Rs y los n de

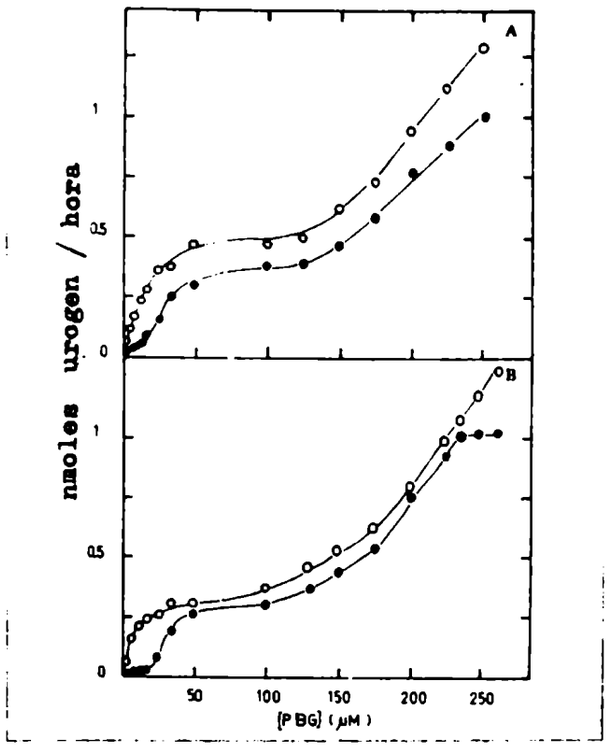


Figura 21: Efecto de la concentración de PBG sobre la velocidad de formación de uroporfirinógenos, catalizada por: A Deaminasa purificada 36 veces de callos de soya y B PBGasa de la misma fuente purificada 30 veces. En ausencia (o) y en presencia (o) de iones amonio 0,1M.

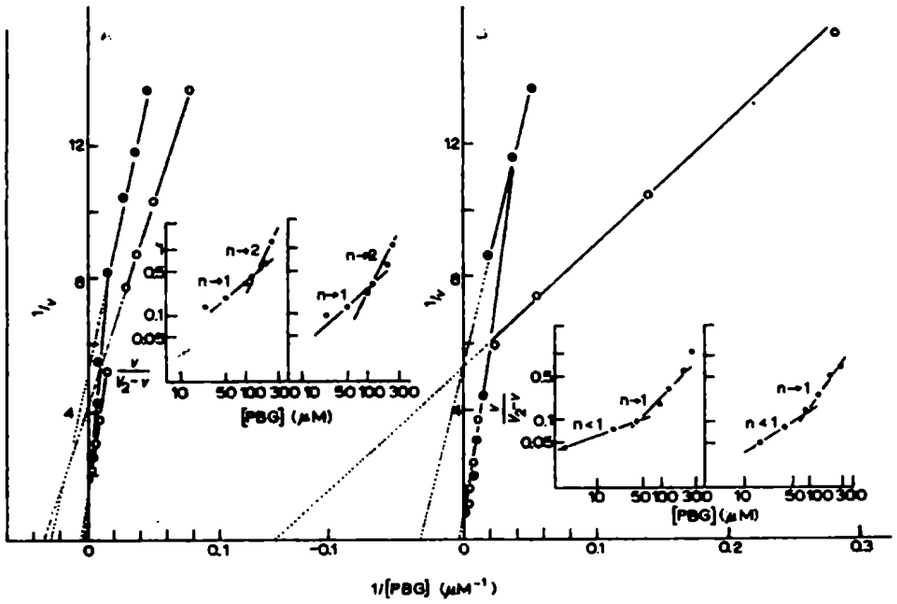


Figura 22: Gráficos de las dobles recíprocas de la velocidad de formación de uroporfirinógenos en función de la concentración de PBG. Los datos corresponden a los ilustrados en la Figura 21 . Se muestran además los gráficos de Hill respectivos.

Hill, tanto para la Deaminasa, como para la PBGasa, así, en algunos casos, los valores de Rs fueron mayores que 81 y correspondientemente los n menores que 1.

Si bien en ese entonces poco común, ya había en la literatura una docena de ejemplos de este tipo de cinética exhibido por las enzimas de callos de soya (Levitzki y Koshland, 1969; Llambías y Batlle, 1970c, y referencias allí incluidas), y de los brillantes trabajos de Levitzki y Koshland (1969), estos autores habían propuesto, que el modelo secuencial de interacción de sub-unidades, era el más adecuado para explicar el complejo fenómeno observado con estas enzimas. De la simple aplicación de estos criterios a la PBGasa y Deaminasa de callos de soya, surgió entonces, que estas enzimas presentaban muchas de las características y respondían a una cinética de cooperatividad negativa. (Llambías y Batlle, 1970b).

V.4.4.-Intermediarios Polipirrólicos

Indudablemente, una pieza clave para la elucidación del mecanismo de acción de este sistema enzimático es la identificación del o de los sustratos de la Isomerasa.

De estos resultados obtenidos estudiando la cinética de las enzimas de callos de soya, se había propuesto que la conversión de PBG en Uroporfirinógenos, ya sea III ó I, podría ocurrir en dos etapas; en la primera tendría lugar la formación de un intermediario polipirrólico y en la segunda, la producción final del Uroporfirinógeno.

Es también importante notar, que hasta el momento, las enzimas de callos de soya, eran el único sistema ensayado en el cual se observara un pronunciado lag en cuanto a la formación del producto Uroporfirinógeno, después del cual, la síntesis del mismo se incrementaba linealmente con el tiempo, (Llambías y Batlle, 1970 a, 1971 a; Stella et al, 1971). Fue interesante asimismo, que cuando se medía el consumo de PBG, no se encontró evidencia alguna de un lag. Además, la cantidad de Uroporfirinógenos formados tanto durante la fase lag, como después, sólo daban cuenta de una parte del PBG consumido. Estos resultados, estaban sugiriendo evidentemente, que en tales condiciones debía estar formándose algún compuesto intermedio, probablemente de naturaleza polipirrólica.

Por otro lado, la fase lag era mucho menos pronunciada o aún podía suprimirse, cuando ese nuevo intermediario estaba presente en la mezcla de la reacción desde el comienzo de la incubación, (Llambías y Batlle, 1971 a), sugiriendo que su ausencia o su lenta formación eran la causa de esa demora en la aparición de Uroporfirinógenos. En consecuencia, todo estaba indicando que se estaba formando un intermediario y se trató de identificarlo en las mezclas de reacción, durante la fase lag, detectándose algunas especies que

absorbían al U.V., similares en sus características de absorción a los pirroles, si bien algunas de las propiedades determinadas para estos compuestos diferían de las propiedades químicas correspondientes a pirroles y pirrilmetanos sintéticos. De todas maneras las evidencias indicaban la presencia de polipirrilmetanos.

Estos intermediairos pirrólicos se separaron de la mezcla de reacción después de la precipitación de la proteina con ácido tricloroacético e inmediata neutralización; las evidencias preliminares sugirieron que podría tratarse de tripirroles, sin embargo resultados posteriores estarían más de acuerdo con una estructura dipirrólica, aunque no puede excluirse la posibilidad de que se tratara de mezclas de diferentes especies de polipirroles y nos inclinamos más sobre esta última alternativa. Desafortunadamente no pudimos llevar a cabo un estudio completo en cuanto a su aislamiento, purificación, identificación y rigurosa caracterización estructural, por cuanto eran necesarias grandes masas de cultivo de callos de soya para obtener cantidades apreciables de enzimas con las cuales preparar biosintéticamente suficientes intermediarios como para llevar a cabo dichos estudios, y ello se vió más dificultado a raíz de que las propiedades de los cultivos de callos de soya fueron modificándose a medida que el clon original era fisiológicamente más viejo; entre los cambios operados ocurrió una significativa disminución de la actividad de las enzimas del camino de las porfirinas, en particular de la PBGasa (Batlle et al, 1975). Se observó así que cuanto más tiempo se había sub-cultivado el callo en la oscuridad, menor era la actividad enzimática. En callos de 6 años, los niveles de PBGas. eran de 10-15 veces menores, los de los callos jóvenes y el fenómeno continuaba en la misma dirección a mayor velocidad, haciéndose así prácticamente imposible la posibilidad de obtener una preparación de enzima suficientemente activa como para una correspondiente buena biosíntesis de polipirroles.

De todas maneras, en las etapas primeras de estos estudios, se demostró claramente, que el intermediario formado cuando se incubaba PBG con la PBGasa, al cual se lo denominó "P", y aquel resultante de la incubación del mismo sustrato PBG, en presencia de la Deaminasa, llamado "D", eran diferentes. Esto era significativamente importante y constituyó la primera evidencia experimental directa, no sólo acerca de la existencia de estos intermediarios, sino lo que es quizás más fundamental, de que, según las condiciones, es decir según actuare el complejo normal de la PBGasa o tan sólo el componente de la Deaminasa, en ausencia de Isomerasa, se formaban intermediarios diferentes que por asimilación podríamos llamar "normales" (P) y "anormales" (D).

Cuando el sobrenadante conteniendo el intermediario P se incubaba con PBG e Isomerasa o PBGasa de diferentes fuentes, se formaba 100% de Uroporfirinógeno III. Cuando en cambio se lo incubaba con PBG y Deaminasa, también

de varios tejidos, se formaba una mezcla de Uroporfirinógenos I y III.

Por otra parte, el sobrenadante conteniendo el intermediario D se convertía enzimáticamente en sólo Uroporfirinógeno I cuando se lo incubaba con PBG y Deaminasa y en una mezcla de Uroporfirinógenos I y III cuando se lo incubaba con PBG e Isomerasa o PBGasa.

Estos datos fueron más que significativamente elocuentes en cuanto a la posible diferencia estructural de los polipirroles P y D. Notemos que la Deaminasa dió lugar a un cierto porcentaje de isómero III cuando actuaba sobre el intermediario P. Igualmente notable es el hecho que a partir de D, Isomerasa o PBGasa formaban parcialmente isómero I. Y también importante es que tanto P como D podían convertirse enzimáticamente en Uroporfirinógenos, pero sólo cuando el PBG también estaba presente en la mezcla de reacción, nunca en su ausencia.

Estos datos nos llevaron a postular que el sobrenadante P contenía un polipirrol normal ya isomerizado, probablemente correspondiendo a una estructura PAAP (Figura 23b) o bien PAAPAP (Figura 23b), que podría ser el primer intermediario en la biosíntesis normal del Uroporfirinógleno III y además, que la formación de ambos isómeros, Uroporfirinógeno III y I, tiene lugar a través de caminos que difieren desde el comienzo de la ciclotetramerización enzimática del PBG; sugiriéndose así, que la isomerización del PBG ocurre en una etapa temprana, la primera tal vez, de la reacción y que sólo puede tener lugar en la presencia de Isomerasa y Deaminasa, es decir por acción del complejo activo completo de la PBGasa. En ausencia de la Isomerasa, entonces se formaría un intermediario diferente. Así, es que el sobrenadante D parecería contener un polipirrol anormal desde el punto de vista biosintético, probablemente un dipirrilmetano no-isomerizado, análogo al descripto por Pluscec y Bogorad (1970), (Figura 23a).

A partir de estos datos, de los estudios cinéticos y de inhibición por diferentes reactivos, se propuso un esquema para explicar el mecanismo de la PBGasa, que tenía en cuenta las posibles vías de formación de los Uroporfirinógenos I y III, (Llambías y Batlle, 1971 a) (Figura 24). Este esquema incorporaba alguna de las características de las hipótesis previas de Cornford (1964) y Bogorad (1966), pero fundamentalmente proponía que la etapa de isomerización debía ocurrir tempranamente, llevando a la formación inicial de un polipirrol intermediario ya isomerizado, en el caso de la vía normal, con la subsiguiente adición de otras moléculas de PBG, una por vez y la producción final del Uroporfirinógeno III. En la ausencia de la Isomerasa, se formaría un polipirrol anormal no isomerizado por supuesto.

No vamos a revisar ahora todos los mecanismos previos a este último, pues ello ha sido ya objeto de otros trabajos (Llambías, 1971; Llambías y Batlle, 1971 a) y más adelante consideraremos en particular aquellos aspectos de

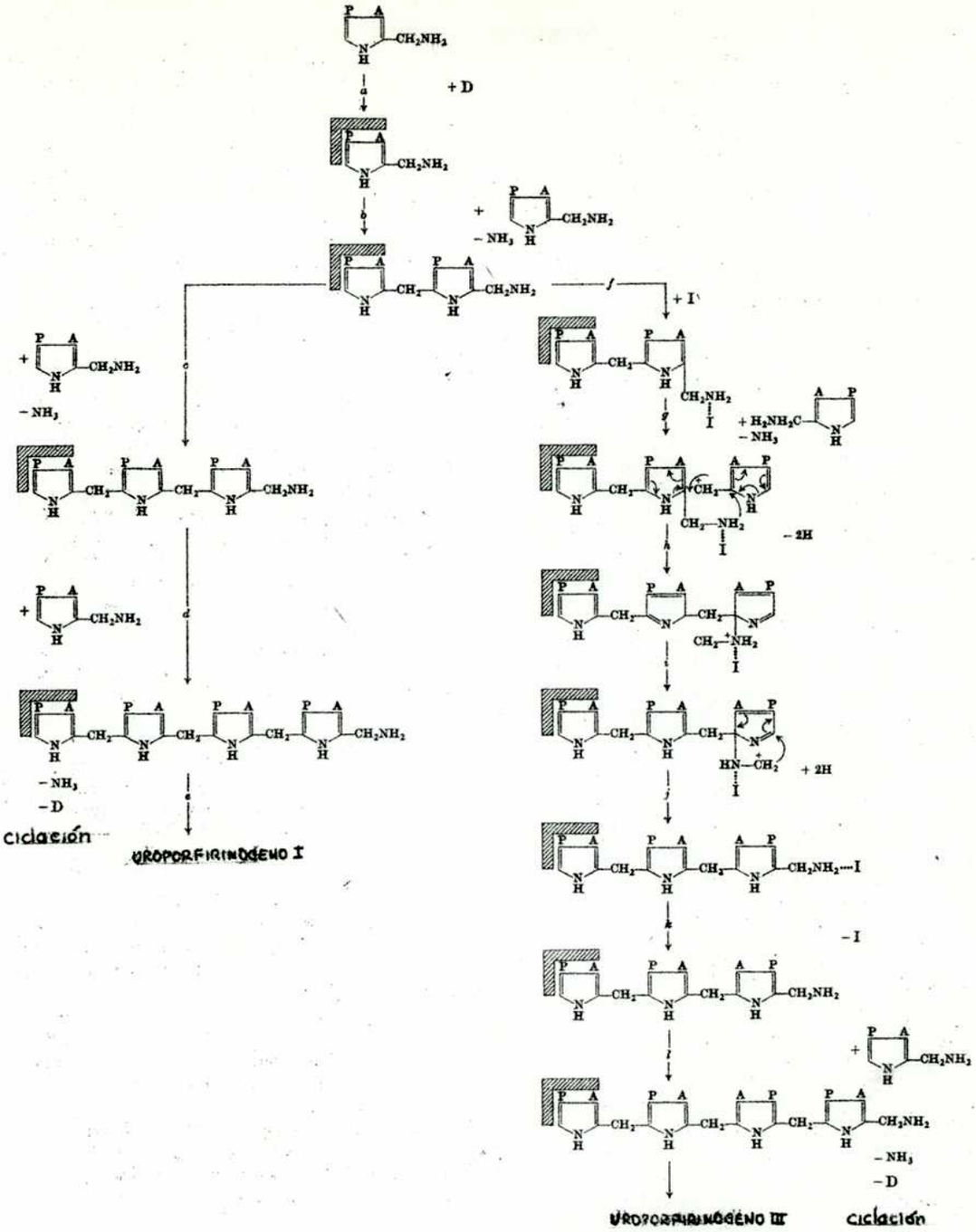


Figura 24: Esquema propuesto para la formación enzimática de uroporfirinógenos I y III a partir de PBG. A= cadena lateral acética; P= cadena lateral propiónica; D o ▞ = Deaminasa ; I= Isomerasa

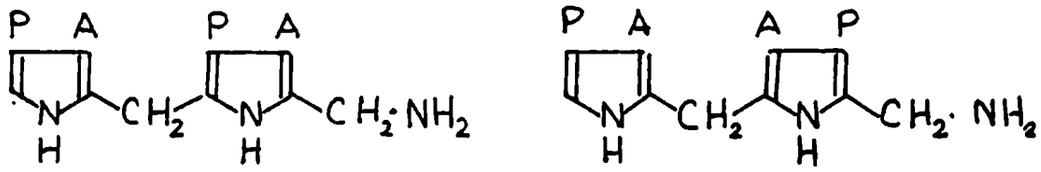
relevancia que se tendrán en cuenta en relación con los resultados de la presente investigación.

Habíamos ya mencionados que altas concentraciones de hidroxilamina y amonio inhibían la síntesis de Uroporfirinógenos en un grado mayor que el consumo de PBG. También dijimos que haciendo uso de este efecto Pluscec y Bogorad (1970) aislaron e identificaron un dipirrilmetano no isomerizado (DPM_1 - Figura 23a), de una mezcla de incubación de Deaminasa de espinaca con PBG en presencia de hidroxilamina. Empleando el DPM 1 sintetizado químicamente, Pluscec Bogorad (1970) y Frydman et al (1971), demostraron luego que este dipirrol no actuaba ni como sustrato ni como intermediario de la síntesis del Uroporfirinógeno III, pero en cambio se comportaba como un intermediario en la formación enzimática del Uroporfirinógeno I.

Estos resultados no estarían de acuerdo con trabajos más recientes del grupo de Battersby (Battersby et al, 1977 a, b, c) quien empleando preparaciones enzimáticas de PBGasa de E. gracilis, ha demostrado que el dipirrilmetano no isomerizado, DPM L, era convertido más eficientemente en el Uroporfirinógeno III, a través de un bilano linear tetrapirrólico no isomerizado, es decir, que según este grupo en la etapa inicial tendría lugar la formación de un dipirrilmetano por medio de una condensación cabezacola de dos unidades de PBG, seguida del mismo tipo de combinación secuencial de otras dos moléculas del monopirrol, hasta dar lugar a un bilano no isomerizado, de 4 unidades de PBG (Figura) y que recién después de esta etapa tendría lugar el mecanismo por el cual ocurriría la inversión de un anillo de PBG.

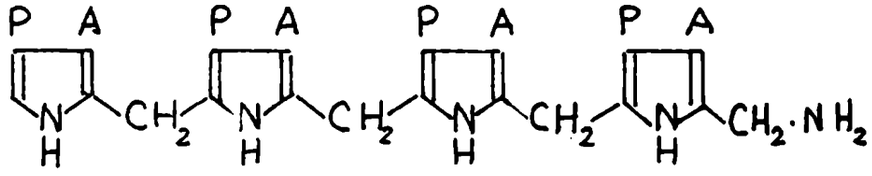
Como también fué demostrado en nuestro laboratorio, pero empleando los intermediarios biosintéticos (Llambías y Batlle, 1970 a), el polipirrol presente en el sobrenadante D, probablemente DPM I, solo podía ser incorporado por la Deaminasa, si el PBG también estaba presente en la mezcla de reacción. Se determinó que la Deaminasa no era capaz de actuar como enzima condensante catalizando la unión de dos moléculas de DPM I, pero sí como una polimerasa. El DPM I también ejercía una fuerte acción inhibitoria sobre la formación de Uroporfirinógeno III, acompañada de un correspondiente aumento en la síntesis del Uroporfirinógeno I.

En 1972, Radmer y Bogorad, identificaron y aislaron de mezclas de incubación de Deaminasa de espinaca y PBG en presencia de amonio, un tetrapirrilmetano (TPM 1, Figura 25), que formaba Uroporfirinógeno I, no enzimáticamente en una reacción de primer orden. El mismo Bogorad (1963) había propuesto años atrás que un compuesto de este tipo era el intermediario polipirrólico en la biosíntesis del Uroporfirinógeno III; sin embargo, él mismo (Radmer y Bogorad, 1972) demuestra ahora que este tetrapirrilmetano no era utilizado enzimáticamente para la formación del isómero III, arrojando bastantes dudas acerca de la validez de su primitiva hipótesis. Sin embargo, por un lado la observación



a-DPM I b-DPM III

Figura 23: Dipirrilmetanos I y III



TPM I

Figura 25: Tetrapirrilmetano I

adicional de que la Deaminasa misma no aceleraba la conversión del tetrapirrol en Uroporfirinógeno I, llevaría a pensar en la probabilidad de que un compuesto de esa naturaleza podría todavía ser un intermediario normal en la síntesis de Uroporfirinógeno III, pero que esta reacción no ocurriría cuando se encuentra libre en solución, pero sí como parte de un complejo transitorio con las dos enzimas. Esta última alternativa podría tal vez, conciliarse si bien no completamente, con los resultados obtenidos por Battersby et al (1977, a), quién demuestra que la incubación de cantidades del orden de los mg (4 mg) del TPM I sintético con PBGasa purificada de E. gracilis produce 70% de isómero III el resto correspondía al isómero I, formado por ciclación no enzimática. Por otro lado, Dauner et al (1976) incubando el mismo bilano sintético no radioactivo (TPM I) obtenido por un método diferente, con PBGasa obtenido de P. shermanii producía un 20% de una mezcla de Uroporfirinógenos, en la cual había de un 14-18% del tipo III y de un 82-86% del tipo I. Estos datos estarían de acuerdo con los del grupo de Battersby, atribuyéndose las diferencias en rendimientos y porcentajes relativos de los Uroporfirinógenos III a I resultantes, a la cantidad de bilano y a la actividad de la PBGasa empleadas, que eran ambas muy superiores en el caso de los ensayos de Battersby et al (1977 a). En contradicción con estos hallazgos, más recientemente, Valasinas et al (1978) han descripto un nuevo método de síntesis para el 2 aminometilbilano (TPM I) y encontrado que este último no es sustrato ni de la Deaminasa ni de la Isomerasa, ni aún del complejo de la PBGasa, siempre en apoyo de la teoría de que en la formación del Uroporfirinógeno III, la inversión de un anillo del PBG debe ocurrir en una etapa temprana de la reacción. Es decir, hasta aquí pareceríamos volver un poco atrás, nuevamente en cuanto al problema del momento en el cual se produciría la isomerización y por ende de la naturaleza misma del mecanismo.

En 1972, Frydman et al (1972 b) demostró que el dipirrilmetano III (DPM III, Figura 23b), se incorporaba específicamente en el Uroporfirinógeno III sugiriéndose que se trataba de un intermediario en su biosíntesis, por acción de la PBGasa, cuando el PBG también se hallaba presente, no así en su ausencia, eliminando nuevamente la posibilidad de una condensación de pares de moléculas de DPM III. Sin embargo, es de notar que la incorporación total de DPM III fue baja y del mismo orden que la obtenida para el caso del DPM I con la Deaminasa, indicando que estos compuestos no se comportarían como sustratos libres de la reacción sino que se trataba de intermediarios. Esta baja incorporación del DPM III y DPM I en el macrociclo de tipo III y I respectivamente obtenida por el grupo de Frydman (Frydman et al, 1972 b) o aún por el de Battersby (Battersby et al, 1973 c), contrastan con la significativa incorporación del DPM I en el Uroporfirinógeno III reportada luego por el mismo Battersby (Battersby et al, 1977 c).

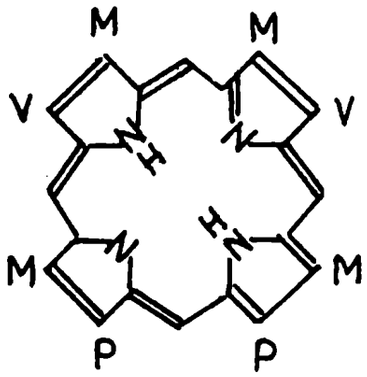
De todas maneras, la mayoría de las evidencias parecía indicar que el

DPM I y el DPM III no actúan como sustratos, ni de la Deaminasa, ni de la Isomerasa ni de la PBGasa; los Uroporfirinógenos formados durante las incubaciones in vitro, resultaban solamente de la dimerización química de los dipirrilmetanos, estableciéndose así, que ni la Isomerasa ni la Deaminasa son enzimas dimerizantes o condensantes.

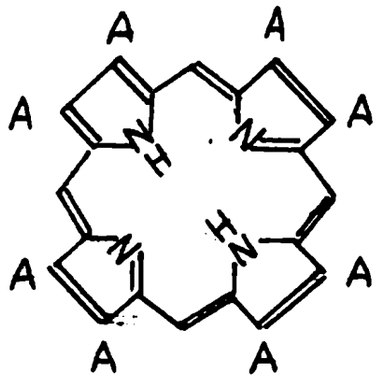
Battersby et al (1973 a) reportaron por otro lado que el DPM I se incorporaba en la Protoporfirina IX, por hemolizados de eritrocitos de pato o extractos crudos de Euglena gracilis. Frydman y Frydman (1975) consideraron que estos resultados en cierto modo inesperados de acuerdo con las evidencias hasta ese momento disponibles, podrían explicarse como debidos a la acción de las enzimas decarboxilantes que se encontraban también presentes en los sistemas crudos allí empleados, sobre el Uroporfirinógeno IV, formado por dimerización química del DPM I, y no a una verdadera incorporación del bilano originado enzimáticamente a partir del DPM I en la Protoporfirina IX, según afirmaban Battersby et al (1973 a); el Uroporfirinógeno IV se decarboxilaría a Coproporfirinógeno IV que puede a su vez actuar como sustrato de la Coproporfirinogenasa, si bien los Coproporfirinógenos I y II no sirven como tales (Porra y Falk, 1964). Bajo estas condiciones, por acción de esta última enzima sobre el Coproporfirinógeno IV, se formaría una Protoporfirina isomérica con la Protoporfirina IX, no fácilmente distinguible una de otra. Como prueba de esta hipótesis, cuando se incubaban sangre entera de patos con Coproporfirinógeno IV sintético (Frydman Frydman, 1975; Al- Hazimi et al, 1976), éste se convertía en el isómero XIII de la Protoporfirina (Figura 26). Si bien estas experiencias avalarían la crítica anterior al trabajo de Battersby et al (1973 a), a la luz de los estudios más recientes, de incorporación del mismo DPM I y del bilano TPM I en Uroporfirinógeno III (Battersby et al, 1977 a, b, c), habría que hacer una revisión de todos los datos hasta ahora encontrados, analizar las hipótesis posibles y eventualmente proyectar nuevas experiencias para dilucidar el camino correcto o por lo menos el más cercano a la realidad; estos aspectos constituyen parte de los objetivos de la presente investigación, por lo cual volveremos a considerarlos más adelante.

Estudiando la incorporación de (2,11 ^{13}C) PBG doblemente marcado en Protoporfirina IX, producida enzimáticamente por sangre de aves y Euglena gracilis, Battersby et al (1973 b) demostraron que era el anillo D, derivado de una unidad de PBG, el que sufría un reordenamiento intra molecular, mientras que las otras tres unidades de PBG se incorporaban intactas en los anillos A, B y C.

Empleando una nueva metodología, Frydman et al (1978) sintetizaron el DPM I, DPM III y un dipirrilmetano que no podía derivar formalmente de una condensación de dos moles de PBG (DPM II, Figura 27), con el objeto de investigar la especificidad del sistema enzimático. La incubación de estos dipirrilmetanos

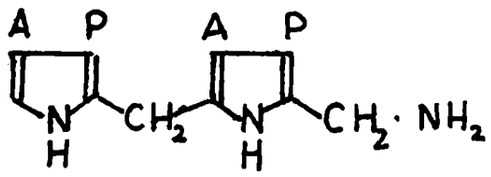


a - Protoporfirina XIII



b - Tetranouroporfirina

Figura 26:



DPM II

Figura 27: Dipirrilmetano II

con PBGasa de eritrocitos, confirmó la incorporación del DPM I en el Uroporfirinógeno I, del DPM II en el Uroporfirinógeno III; en tanto que el DPM II no se incorporaba en ninguno de los isómeros, ejerciendo por el contrario un efecto inhibitorio sobre el sistema Deaminasa-Isomerasa.

Hasta aquí, ya sea de acuerdo con la teoría de Battersby et al (1977, a, b, c) según la cual la isomerización tendría lugar después de la formación de un bilano lineal no isomerizado; o de acuerdo con las propuestas de nuestro laboratorio (Llambías y Batlle, 1970 a, 1971 a) y de Frydman y Frydman (1975), en las cuales las evidencias experimentales parecían indicar que la isomerización ocurriría en la etapa inicial de condensación de las dos primeras moléculas de PBG; en ambos casos, habría acuerdo en cuanto a que aminometildipirrilmetanos estarían involucrados en la reacción, sólo que se llegaría a conclusiones diferentes respecto al momento en el cual ocurriría el proceso de reordenamiento o isomerización. Con el objeto de alcarar o definir de alguna manera esta situación Scott et al (1976) desarrollaron un nuevo enfoque para el estudio de esta reacción, que aparentemente ha provisto la forma de distinguir mecanísticamente entre ambas posibilidades. (Figuras 28 y 29).

La Figura 28 correspondería a la vía del bilano simétrico, coincidente con el esquema de Mathewson and Crowin (1961), en tanto que la Figura 29 se adaptaría a las hipótesis de Cookson y Rimington (1954) y Bullock et al (1958). En el último esquema, si bien la reacción sería intramolecular en un sentido estrictamente químico, a través del reordenamiento concertado 7 ⟶ 6 (camino A), no puede excluirse la posibilidad de que tenga lugar un reordenamiento intramolecular enzimático según 7 ⟶ 8 ⟶ 6 (camino B). Scott et al (1976) diagramaron una experiencia relativamente simple en la cual emplearon un dipirometano simétrico, que temporariamente había perdido su resto o "cabeza" aminometilo (Figura 30). Si el mecanismo de la Figura 29 fuera operativo, este dipirrometano "sin cabeza" podría intercambiarse con una molécula idéntica formada a través del camino B. Incubando entonces este compuesto marcado con C^{14} con PBGasa purificada de espinaca o extractos libres de células de Clostridium tetanomophum y con células enteras de P. shermanii, observó en todos los casos que este dipirrometano se incorporaba en el Uroporfirinógeno III y no en el isómero I. Lo cual lo condujo a proponer, que este compuesto se debía intercambiar necesariamente con una molécula igual; lo cual estaba revelando que durante la reacción el resto aminometilo se desprendería totalmente del dipirrilmetano formado en el primer paso de la reacción; además se vió que se incorporaba específicamente en el Uroporfirinógeno III; esto estaría aportando una prueba clara de que la síntesis del isómero III está controlada por la formación del DPM III, es decir estaría apoyando la hipótesis de que la inversión del anillo D se produciría al principio del proceso, es decir durante la condensación de las dos primeras moléculas de PBG; por un mecanismo cabeza-cola, aunque

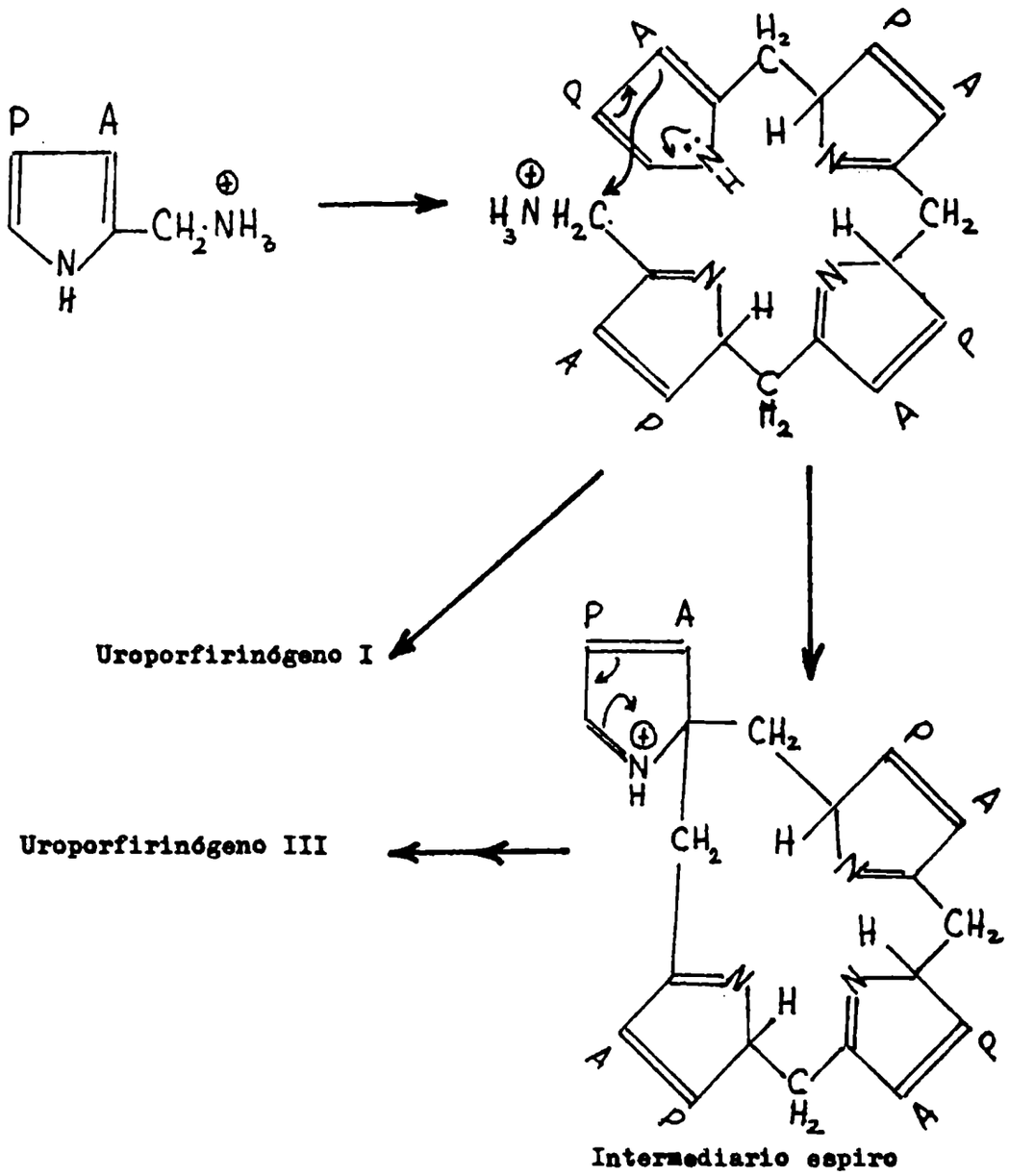


Figura 28: Hipótesis de Corwin para la formación del Uroporfirinógeno III o I.

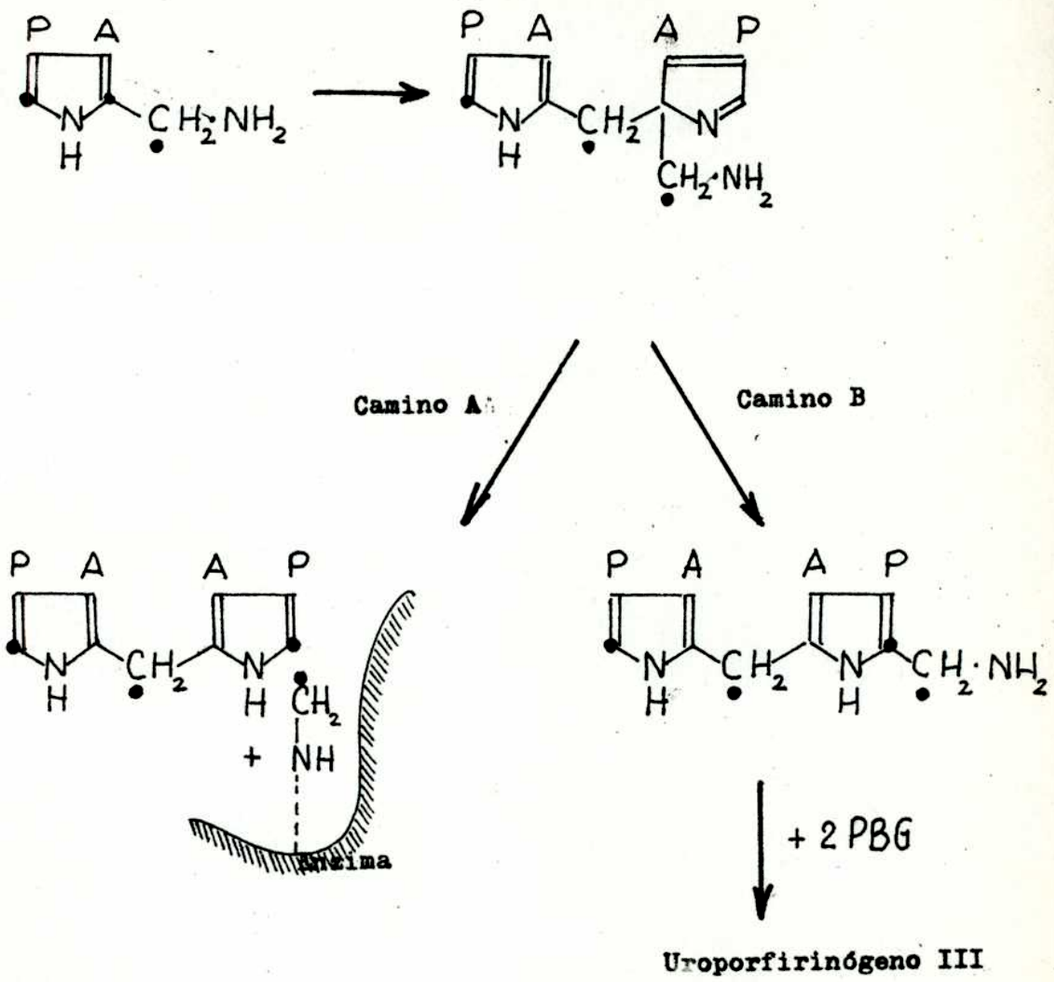


Figura 29: Hipótesis de Rimington - Johnson

a través de una transferencia del grupo aminometilo algo diferente a la considerada hasta entonces (Figura 31).

Según Scott et al (1976) este mecanismo estaría de acuerdo con la mayoría de las evidencias experimentales y tendría en cuenta por ejemplo, el singular efecto de los iones Mg^{2+} observado para las enzimas de callos de soya (Llambías y Batlle, 1971 a) y eritrocitos de aves (Llambías y Batlle, 1971 b; Llambias et al 1971), implicando la posible existencia de un catión divalente en el sitio catalítico de la enzima. Es también posible que el resto $-NH_2$ corresponda a un grupo amino o imidazol o quizás arginina sobre la enzima, evidenciado estudiando la acción de ciertos reactivos sobre la actividad enzimática (Llambías y Batlle 1971 a, b; Sancovich et al, 1976; Pollak y Russell, 1978).

El tripirrano I (Figura 2a) ha jugado un papel importante en muchas de las hipótesis propuestas para explicar el mecanismo de acción de la PBGasa (Llambías y Batlle 1971 a). Originalmente, Bogorad (1963) lo había propuesto como uno de los intermediarios más probables, formado por acción de la Deaminasa, junto con el PBG. Frydman et al (1974 b) lograron sintetizar este 2-amino metil tripirrano y estudiaron su interacción con las enzimas involucradas en la biosíntesis de los Uroporfirinógenos. Se demostró que el tripirrano I no era sustrato de la Isomerasa, ya fuera agregado sólo o bien en presencia de PBG en la mezcla de reacción; tampoco funcionó como sustrato de la Deaminasa, en ausencia de PBG. Asimismo inhibía la síntesis enzimática de Uroporfirinógeno III. Se incorporaba en el Uroporfirinógeno I pero en un grado reducido, de manera que no puede considerarse que sea un sustrato de la Deaminasa tambpoco, aunque si podría ser un intermediario en la formación de Uroporfirinógeno I.

Cuando se investigó la interacción del tripirrano III (Figura 32b) con las mismas enzimas (Frydman et al, 1978) se encontró que no actuaba como sustrato ni de Isomerasa ni de Deaminasa ni de PBGasa, ya fuera sólo o en presencia de PBG. Su agregado no aumentaba la formación enzimática de Uroporfirinógeno, por el contrario ejercía un efecto inhibitorio sobre la síntesis total de Uroporfirinógenos, en particular sobre el tipo III; el tripirrano III tampoco se incorporaba en el Uroporfirinógeno I. Asimismo se prepararon sintéticamente otros dos tripirranos II y IV (Figura 33 y 34) y como en los otros casos se estudió su comportamiento frente a las enzimas, (Frydman et al, 1978). Cuando el tripirrano II se incubó en presencia de PBG y de PBGasa, Deaminasa o Isomerasa se observó que ejercía un efecto inhibitorio mayor sobre la formación de Uroporfirinógeno III que sobre el Uroporfirinógeno I, no comportándose como sustrato de ninguna de las enzimas. Cuando el tripirrano IV se incubó con PBGasa y PBG, se produjo una inhibición de la cantidad total de Uroporfirinógenos; algo análogo sucedió empleando la Deaminasa y PBG. Este tripirrano no se comportó ni como sustrato ni como intermediario en la biosíntesis de Uroporfirinógeno III, ni de Uroporfirinógeno I. Más aún su efecto inhibitorio fue mayor sobre la formación

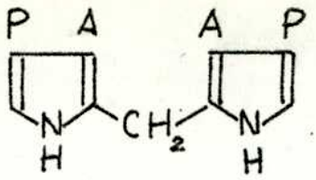


Figura 30: Dipirrometano "sin cabeza"

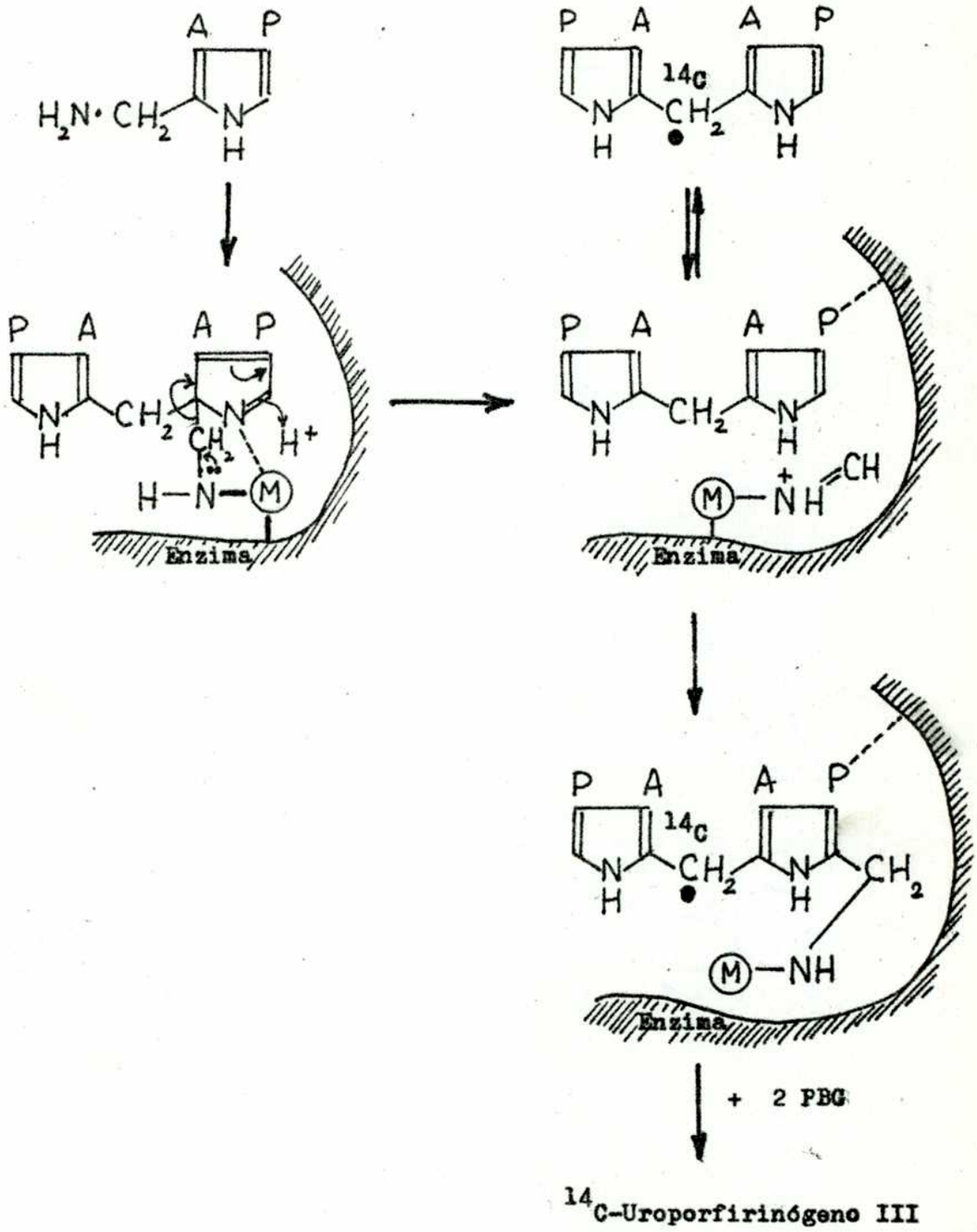


Figura 31: Hipótesis de Scott, del dipirrilmetano "sin cabeza"

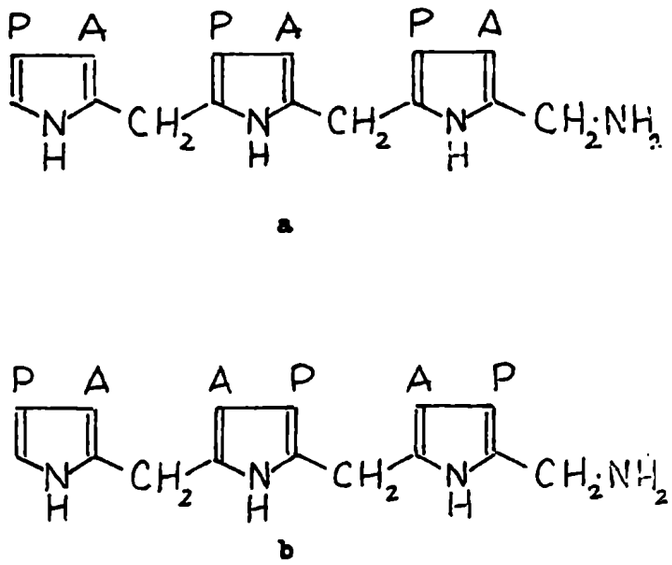


Figura 32: Tripirranos I (a) y III (b)

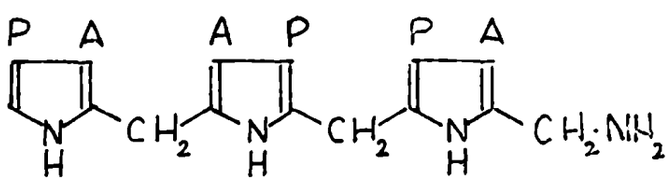


Figura 33: Tripirrano II

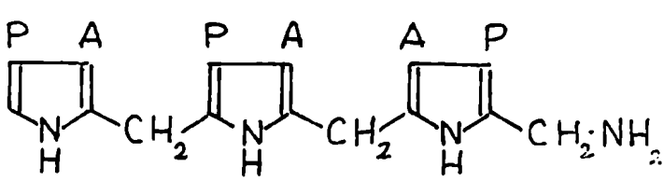


Figura 34: Tripirrano IV

del Uroporfirinógeno III. Estos últimos resultados no están sin embargo, de acuerdo con los obtenidos por Franck et al (1977 a, b) quienes empleando una metodología distinta sintetizaron químicamente el tripirrano IV (Figura 35) y otro tripirrano V (Figura 36) (Franck et al 1977 a), que por su estructura podrían ser precursores de la biosíntesis de Uroporfirinógeno III. Incubando cantidades variables (o.5 -4 mg) de los tripirranos IV y V, marcados con C^{14} y H^{3} durante 5 ó 24 horas a 32º, con 25 ml de hemolizado de sangre de pato, encontraron que ambos tripirroles se incorporaban significativamente en el hemo formado, si bien el IV lo hacía en una proporción 2.2 veces mayor que el V. Del uso de mezclas de IV y V se observó una incorporación competitiva entre ambos, sugiriéndose que a pesar de que uno de ellos era el precursor biosintético preferido, el sistema enzimático de sangre de pato también podía usar oligopirroles isoméricos; de manera que como ocurre con otros productos naturales, la enzima es capaz de emplear no sólo uno sino varios intermediarios para la biosíntesis del hemo, si bien estos intermediarios pueden utilizarse con eficiencias diferentes. Este hecho, sumado a que en otros casos se han usado muy pequeñas cantidades de dipirroles y oligopirroles (nmoles), a que existe una gran variación en las actividades enzimáticas así como de las fuentes de enzimas y a la notable tendencia de estos oligopirroles reactivos a sufrir una condensación no enzimática, explicarían quizás los hallazgos aparentemente contradictorios encontrados con precursores análogos, (Frydman et al 1975, 1978 a, b; Battersby et al 1977 a, b, c; Franck et al 1977 a, b; Scott et al 1976).

Aún así, los datos anteriores parecerían apoyar la hipótesis de que la isomerización del anillo D del PBG es una etapa temprana en la biosíntesis del Uroporfirinógeno III y que tanto el Uroporfirinógeno I como el Uroporfirinógeno III se originan a través de caminos diferentes desde el comienzo mismo de la reacción.

Además ciertas evidencias indirectas sugerirían de que por lo menos en condiciones normales, la formación del polipirrol tendría lugar sobre la superficie de la enzima hasta su ciclización, con muy poca o ninguna liberación al medio de intermediarios libres.

Como ya se mencionó, Pluscec y Bogorad (1970) encontraron que cuando la Deaminasa se incubaba con PBG en presencia de hidroxilamina, se acumulaba DPM I (Figura 28a); sin embargo, Davies y Neuberger (1973) no pudieron confirmar estos resultados completamente; así cuando estos últimos autores incubaban Deaminasa obtenida de Rh. spheroides con PBG en la presencia de hidroxilamina, amoniaco o metoxiamina, aislaron diferentes intermediarios, empleando el método de filtración por geles de Sephadex G-25. De sus perfiles de elución y de su rápida y cuantitativa conversión en Uroporfirinpogeno I, se sugirió que todos esos intermediarios serían tetrapirroles de cadena abierta, en los cuales el grupo amino del sustituyente lateral aminometilo de la unidad pirrol termi-

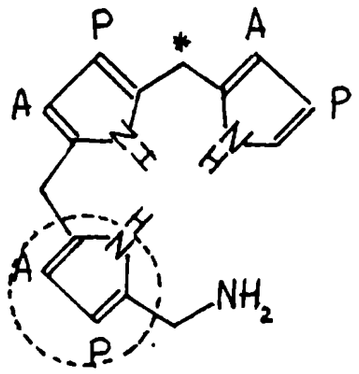


Figura 35: Tripirrano IV de Franck

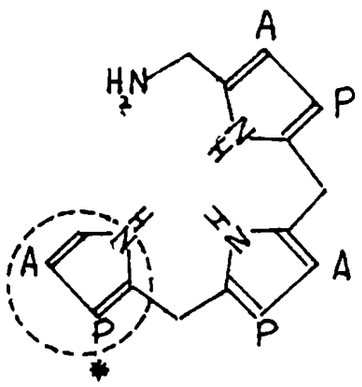


Figura 36: Tripirrano V

nal ha sido reemplazado por las bases; contienen una posición α pirrólica libre y son relativamente inestables. Estos polipirroles no eran utilizados por la Deaminasa, ni tampoco inhibían la conversión enzimática del PBG en Uroporfirinógeno I.

En base a sus pesos moleculares y al hecho de que formaban Uroporfirinógeno I en una reacción de primer orden, por calentamiento y a la correspondiente eliminación de hidroxilamina o amonio o metoxiamina, cuando se ciclaban a Uroporfirinógeno, se propusieron para esos intermediarios las estructuras que se ilustran en la Figura 37b-d. Empleando hidroxilamina se aislaron asimismo pequeñas cantidades de un monopirrol modificado además del tetrapirrol que sería un 2-hidroxil-aminometil-3-carboximetil-4-carboxietil pirrol (Figura 37a).

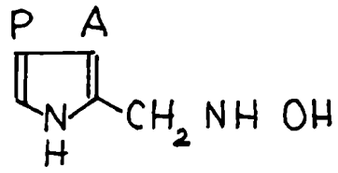
Los autores proponen que estos tetrapirroles sustituídos se forman probablemente por reacción de las bases con el complejo enzima-polipirrol, con la subsiguiente liberación del producto modificado de la superficie de la enzima. Se ha sugerido que la ciclización final implica un ataque electrofílico de un grupo $-CH_2^+$ del pirrol de un extremo, sobre la posición α libre de la unidad ubicada en el otro extremo; parecería que esta etapa sería más susceptible a la inhibición por las bases, que interferirían compitiemdo con el grupo metileno cargado positivamente, que las etapas previas de condensación de unidades de PBG.

De acuerdo con esta hipótesis, el mecanismo de inhibición de las aminas, se explicaría asumiendo que las bases liberarían al polipirrol de su sitio de unión a la enzima, por un desplazamiento mucleofílico sobre el metileno positivo, que sería precisamente el punto de enlace.

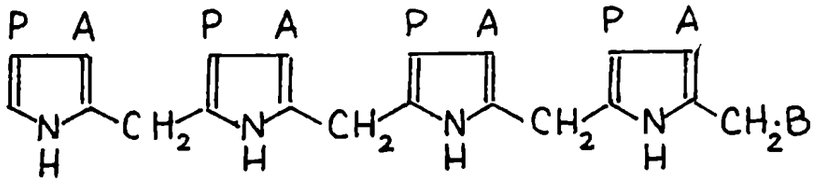
V.4.5-Evidencias adicionales de interés

Según uno de los primeros mecanismos propuestos para la conversión de PBG en Uroporfirinógeno III (Carpenter y Scott, 1959), se había sugerido que el ácido opsopirrol dicarboxílico (Figura 38a) o bien el isoporfobilinógeno (Figura 38b) podrían actuar como coenzimas de la Isomerasa. Estos pirroles se sintetizaron químicamente y se estudió su acción sobre las enzimas de la formación de Uroporfirinógenos, encontrándose que ninguno de ellos estaba relacionado con la biosíntesis del Uroporfirinógeno III o I (Carpenter y Scott, 1959, 1961; Bogorad, 1960), sino que se comportaban como inhibidores competitivos del PBG.

Paralelamente se demostró que varias dipirrilmetanos con todas sus posiciones α libres (Figura 39a-c), también eran inhibitorios, aunque no-competitivamente (Hoare y Heath, 1960), mientras que el carboxi-porfobilinógeno (Figura 38c), que no contiene ninguna posición α libre, y un dipirrilmetano con todas sus posiciones α ocupadas (Figura 39d), no tenían efecto alguno (Hoare y Heath, 1959).



a.



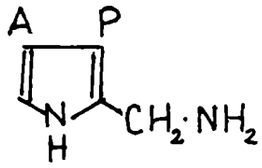
B= NH·OH b.

NH_2 c.

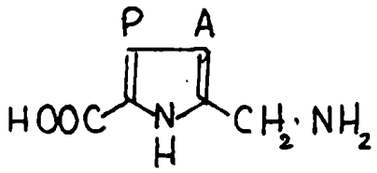
$NH{\cdot}OCH_3$ d

Figura 37:

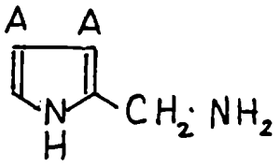
ácido opso pirrol dicarboxílico



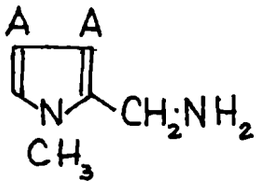
iso-PBG



carboxil-PBG



nor-PBG



N-metil nor-PBG

Figura 38:

Estos resultaron, revelaron que todos los pirroles que inhibían las enzimas, poseían en común dos sustituyentes en β, propiónicos o acéticos y eran pirroles α, o α-α' libres; en consecuencia, para la unión con la enzima, es necesaria una posición α libre, y además deben existir dos sitios de contacto, que son específicos para las cadenas laterales de los restos propiónicos y acético respectivamente, asegurándose así que los grupo α-amino metilos se orienten en la forma correcta.

Frydman y Feinstein (1974), obtuvieron resultados similares de estudios posteriores.

Recordemos aquí que algunos derivados dicarboxílicos aromáticos y alifáticos inhibían la actividad de la Deaminasa (Llambías y Batlle, 1971a, b), apoyando la idea de que sobre esta enzima existían dos sitios de unión que serían específicos para las cadenas laterales propionato y acetato del PBG; además la 2-metoxinitrotropona, que reacciona específicamente con grupos amino libres proteicos, también inhibía la Deaminasa (Llambías y Batlle, 1971a, b; Sancovich et al, 1976). También reiteremos que el formaldehido, que se libera durante la polimerización química del PBG, no era ni un reactante de la síntesis enzimática (Lockwood y Benson, 1960), sino por el contrario un potente inhibidor de la Deaminasa (Bogorad 1958a). Es conocido que el formaldehido puede reaccionar con grupos lisil y otros restos básicos de las proteínas, por lo cual podrían también actuar aquí, modificando aquellos grupos con los cuales el PBG se une normalmente.

Cuando el dipirrilmetano mostrado en la Figura 39a se incubó con PBGasa, inhibió significativamente la formación de Uroporfirinógeno III y no se incorporó en ninguno de los isómeros (Frydman et al 1971), si bien estos resultados confirmaban los de Hoare y Heath (1960) también estaban sugiriendo que durante la síntesis enzimática de los Uroporfininógenos, el grupo 2 aminometilo no puede encontrarse completamente separado de la unidad polipirrólica en crecimiento; pero en cierto modo serían inconsistentes con los hallazgos más recientes de Scott et al (1977), quién encontró incorporación de ese mismo dipirrol "sin cabeza" en el Uroporfirinógeno III, nuevamente podríamos atribuir estas diferencias, a que los últimos autores han empleado cantidades mucho mayores del dipirrol y preparaciones enzimáticas de actividades y fuentes distintas

En un intento de encontrar un nuevo inhibidor nucleofilico de la síntesis de Uroporfirinógenos a partir de PBG, catalizada por la PBGasa de hígado bovino, Yuan y Russell (1974), estudiaron la reacción no enzimática del PBG con imidazoles. Encontraron, que los productos de estas reacciones, cuyas estructuras se muestran en la Figura 40 ; podrían reemplazar efectivamente al PBG como sustratos, convirtiéndose con alto rendimiento en Uroporfirinógeno III.

Estos derivados reaccionan con el reactivo de Ehrlich más lentamente

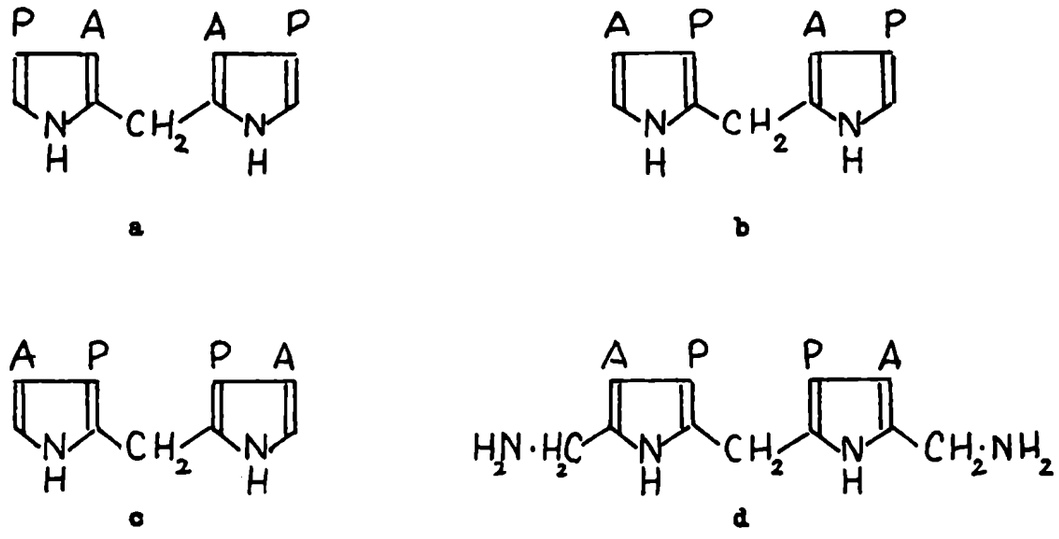


Figura 39:

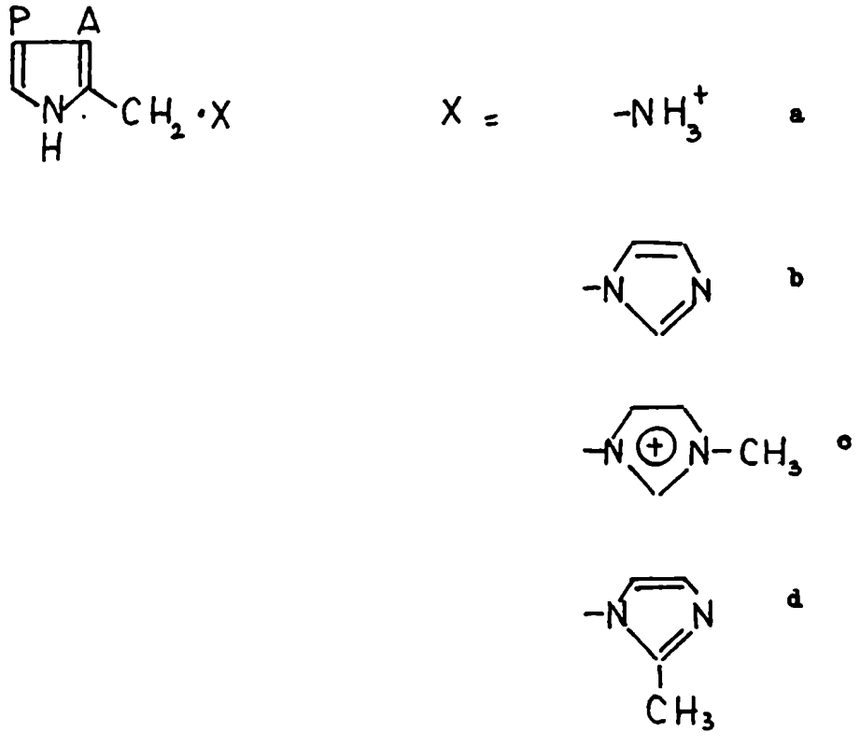


Figura 40:

que el PBG y también se diferencian de éste por cromatografía en capa delgada y electroforesis. En todos ellos, vemos que el imidazol reemplaza el resto amonio en el PBG, dejando la posición α libre.

Como hemos ya reiterado, no hay dudas acerca de que el sitio activo de la PBGasa revela cierta especificidad por las cadenas acídicas del PBG; pero de acuerdo a los hallazgos de Yuan y Russell (1974) estos autores sugieren que la enzima es mucho menos discriminativa con respecto a la naturaleza del grupo básico que se libera durante la condensación, es decir el grupo amino del resto aminometilo lateral en α , que podría, como vimos, ser reemplazado por imidazoles sin que ocurra alteración alguna de la actividad enzimática ni del tipo de producto formado.

Vale la pena recordar nuevamente, que los iones amonio e hidroxilamina eran pobres inhibidores de la Deaminasa, pero que sin embargo afectaban significativamente a la Isomerasa; se propuso que esto se debía a que las bases interferirían con la unión del grupo aminometilo, del PBG a la Isomerasa (Conford 1964; Llambías y Batlle, 1971a, b), o también podrían actuar alterando la interacción entre Deaminasa e Isomerasa, y por ende modificando la necesaria formación del conplejo activo (Stella et al, 1971).

Recientemente, Franck et al (1976), han llevado a cabo estudios acerca de la polimerización química del PBG y por otro lado, como vimos también han sintetizado varios di, tri y tetrapirroles formalmente derivados del PBG, con el objeto de estudiar su reactividad química y biológica. Así obtuvieron un nor-PBG (Figura 38d) sometiéndolo a una condensación ácida; encontraron que se obtenía con muy alto rendimiento solamente una tetranouroporfirina (Figura 26b) no detectándose ni trazas de otros productos de la condensación del nor-PBG derivados de oligómeros no-ciclicos. Estos autores explicaron la notable preferencia de esa ciclotetramerización, analizando las posibles conformaciones del tetrapirrol lineal, que sería el precursor directo de la porfirina (Figura 41) y concluyeron que la conformación cíclica necesaria para que tuviera lugar el cierre del anillo, era la más favorecida por una relativamente alta estabilidad. Presentaba muy pequeñas interacciones estéricas entre las cadenas laterales y permitía que los átomos de hidrógeno de los grupos metilenos adoptaran un ordenamiento óptimo en relación con el anillo pirrólico adyacente.

Franck y Wegner (1975) también habían sintetizado N,N',N'',N''' tetrametil derivados de porfirinógenos y porfirinas a partir del N-metil-nor PBG (Figura 38c), con el fin de obtener mayor información acerca de la estereoquímica y de la relación estructura-actividad biológica de estos compuestos. De sus resultados ha surgido que son necesarios sustituyentes más grandes que un N-metilo sobre los átomos de N pirrólicos, para prevenir la síntesis de tetrapirroles cíclicos, durante la condensación del PBG.

Por cuanto es aún imposible aislar oligómeros lineales del PBG, atra-

pándolos durante su condensación química catalizada por ácidos, fue necesario prepararlos por síntesis para investigar su reactividad (Franck y Rowold,1975). Franck et al, (1976) han encontrado que el tetrapirrilmetano lineal I (TPM I, Figura 15), posee una muy alta reactividad y tendencia a la condensación química,. También demostraron que el DPM I (Figura 23a) se condensaba a su vez, químicamente, a una velocidad 100 veces mayor que el PBG. El TPM I, se polimerizaba in vitro, predominantemente a Uroporfirinógeno I (80%) prácticamente sin isomerización, mientras que no sucedía lo mismo con el tripirrol I (Figura 32a), que producía una mezcla de 1:1 de Uroporfirinógeno I y III. El hecho de que el TPM I se cicla, con tan baja isomerización, agregaría una prueba más en favor de la hipótesis de que la inversión del pirrol D en la biosíntesis del Uroporfirinógeno III, debería ocurrir durante las primeras etapas de la condensación.

Finalmente, la identificación de 2,4-dimetil-3-etil pirrol (kriptopirrol, Figura 42a) en la orina de pacientes psicóticos y porfíricos (Irvine et al, 1969; Irvine y Wetterberg, 1972; Brodie et al, 1976), también estaría de acuerdo con que el reordenamiento del anillo D del PBG ocurriría en una etapa temprana unido a la enzima; aunque más recientemente se haya demostrado, empleando una metodología más precisa y haciendo una evaluación de las técnicas empleadas por los otros autores, que tanto hemopirrol como kriptopirrol están ausentes en la orina de personas normales, esquizofrénicos o porfíricos (Jacobsen et al, 1975; Gendler et al, 1978).

También se han detectado en heces, orina y bilis de pacientes con distintos tipos de Porfirias, pigmentos dipirrólicos (Figura 42b) que podrían ser productos laterales de la biosíntesis de porfirinas (Siedler y Moller, 1939; Siedler et al, 1947; Gilberstein et al, 1959). Si las estructuras propuestas (Siedler y Moller, 1939) son correctas, también encajarían con la hipótesis de una isomerización temprana del PBG.

Mas recientemente, Sears y Eales (1974) aislaron de la orina de un paciente con PAI un pigmento con las características de un dipirrilmetano, que tenía los sustituyentes ordenados en forma tal que correspondería a los de una Uroporfirina I.

Todos estos antecedentes que hemos descripto son de significativa importancia para la evaluación de los resultados obtenidos en la presente investigación y se tendrán muy en cuenta, en particular cuando se discutan los mismos y en base a ello se proponga un mecanismo de acción para esta enzima.

4.6.-El rol de la PBGasa en el camino metabólico de las porfirinas

Ya se comentó en los comienzos de este capítulo que la elucidación del mecanismo de formación de los Uroporfirinógenos tiene un interés doble, desde el punto de vista científico y también por su estrecha relación con los estudios de las Porfirias.

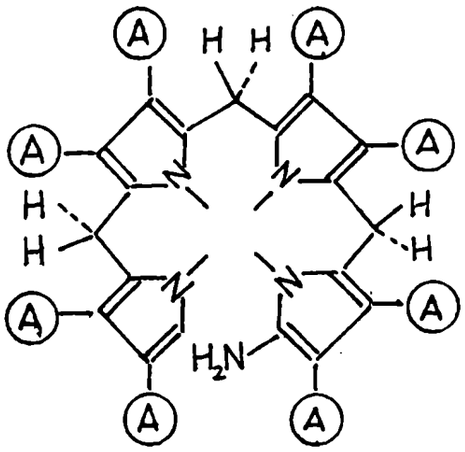
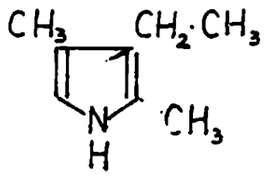


Figura 41:



a. kriptopirrol

b. dipirrilmetenos (fuscinas)

Figura 42:

Recordemos brevemente que las Porfirias son desórdenes del metabolismo de las porfirinas, hereditarios o adquiridos, con características clínicas y bioquímicas típicas para cada Porfiria, directamente relacionadas con el tejido en el cual se expresa la falla, así como con la o las etapas del camino metabólico que se encuentran afectadas.

En la mayoría de las Porfirias en general, a causa de una alteración primaria de distintas enzimas involucradas en la biosíntesis de los tetrapirroles, se observa un aumento de la actividad del ALA-S, la enzima primera y limitante.

Sin embargo, la excesiva formación de los precursores ALA y PBG, más que las porfirinas mismas en la PAI; la acumulación de porfirinas altamente carboxiladas, tales como Uroporfirinas, principalmente de tipo I, en la PCE; la anormal distribución de los isómeros de la Coproporfirina, en el sindrome de Dubin-Johnson (SDJ), donde se aprecia un remarcable aumento en la excreción urinaria de Coproporfirina I, con una disminución concomitante de Coproporfirina III; eventualmente el aumento en la excreción urinaria de ALA y también de PBG, observado en muchos casos de intoxicación con plomo, y aún la relativamente elevada proporción de Uroporfirina I con respecto al isómero III producido por pacientes con PCT; implican necesariamente la existencia de otros y más específicos defectos enzimáticos en la biosíntesis de porfirinas, además del previamente demostrado aumento de la actividad del ALA-S. Como analizaremos rápidamente, en los casos recién mencionados, PAI, PCE, SDJ, intoxicación con plomo y posiblemente también PCT, cambios en la actividad de la PBGasa o bien de sus componentes Deaminasa o Isomerasa, son los responsables de ese patrón de formación y excreción anormal de precursores y porfirinas observado.

Porfiria Aguda Intermitente: En la PAI, la excreción de ALA y PBG se encuentra marcadamente aumentada; sin embargo no hay un incremento correspondiente en las porfirinas que se forman después del PBG. Se sabe que ese exceso de precursores tiene su origen en el hígado, en el cual se ha demostrado, que además de un aumento del ALA-S (Tschudy et al, 1965; Nakao et al, 1966; Dowdle et al, 1967; Masuya, 1969; Sweeney et al, 1970; Strand et al, 1970) hay también una disminución de la Uroporfirinógeno Sintetasa o Deaminasa (Figura 43) (Heilmayer y Clotten, 1969; Strand et al, 1970; Miyagi et al, 1971). Se ha encontrado asimismo que esta enzima se halla reducida no sólo en hígado, sino también en fibroblastos (Meyer, 1973; Bonkowsky et al, 1973), y es cada vez más creciente el número de trabajos que reportan la detección de esta deficiencia en eritrocitos, lo cual se ha constituído de por si un elemento de diagnóstico de gran valor tanto para pacientes sintomáticos como asintomáticos, niños y aún en fetos, más aún teniendo en cuenta que la PAI se hereda de acuerdo a un carácter autosómico dominante (Meyer et al, 1972; Strand et al, 1972; Sassa et al, 1973; Meyer, 1973; Sassa et al, 1974; Magnussen et al, 1974; Grandchamp et al, 1975; Koehl et al, 1975; Schumabek et al, 1976; Nordman y Grandchamp, 1976; Grandchamp et

al, 1976; Beauvais et al, 1976; Peterson et al, 1976; Iwanov et al, 1977; Kreimer-Birnbaum, 1977; Batlle et al, 1978; Astrup, 1978).

En consecuencia, esta anormalidad enzimática parecería ser el defecto enzimático primario en el camino del hemo, en los casos de PAI. La elevación del ALA-S hepática, acoplada a una deficiencia de la Deaminasa explicarían perfectamente la aumentada formación y excreción de ALA y PBG.

Porfiria Congénita Eritropoyética: Como ya dijimos la PCE fue una de las primeras porfirias reconocidas (Schultz, 1874), y al mismo tiempo es una de las formas más raras de porfiria, se hereda según un carácter autosómico recesivo. La principal manifestación de la enfermedad es la fotosensibilidad, pero son también de importancia la eritrodoncia, anemia hemolítica y porfirinuria. La mayoría de estas manifestaciones pueden explicarse como debidas a la producción en los eritroblastos en desarrollo en la médula ósea, depósito en los tejidos y excreción en heces y orina de grandes cantidades de Uro y Coproporfirina I. El Uroporfirinógeno I y el Coproporfirinógeno I no son intermediarios normales en la biosíntesis de Protoporfirina IX. Entre los distintos modelos que se han propuesto para explicar el o los defectos enzimáticos responsables de esta enfermedad, los tres siguientes parecerían armonizar con el cuadro bioquímico que generalmente caracteriza la PCE (Figura 44). Ya sea que la actividad de la Isomerasa se encuentra disminuida (Levin, 1968) o que la actividad de la Deaminasa está aumentada (Heilmeyer et al, 1963; Watson et al, 1964), o bien que puedan existir simultáneamente un aumento de la Deaminasa y una relativa deficiencia de la Isomerasa (Batlle et al, 1978 a,b).

La primera hipótesis encontró sólido apoyo en los estudios de Levin, que demostró que la actividad de la Isomerasa, en hemolizados de humanos y ganado bovino con PCE, era mucho menor que en controles normales (Levin, 1968 a; Romeo y Levin, 1969), reforzando la idea de que los desórdenes en humanos y animales eran bioquímicamente similares. Desde ya que no podemos esperar encontrar una ausencia completa de la Isomerasa, como de ninguna de las enzimas del camino de los tetrapirroles, pues el Uroporfirinógeno III es un intermediario esencial en la biosíntesis de un compuesto vital, como lo es el hemo. Una deficiencia parcial de Isomerasa en los tejidos eritropoyéticos explicaría la superproducción de porfirinógenos y porfirinas de la serie I, que serían los responsables de la fotosensibilización, eritrodoncia, porfirinuria y muy probablemente también de la anemia hemolítica.

La demostración de que la actividad de Isomerasa es menor enhemolizados de pacientes con PCE que en individuos normales apoyaría la hipótesis de que la deficiencia en esta enzima es la falla primaria trasnmitida genéticamente que lleva a la porfiria.

Esta idea fue todavía reforzada con el hallazgo de que la actividad de Isomerasa en hemolizado de transportadores asintomáticos de PCE humanos y bovi

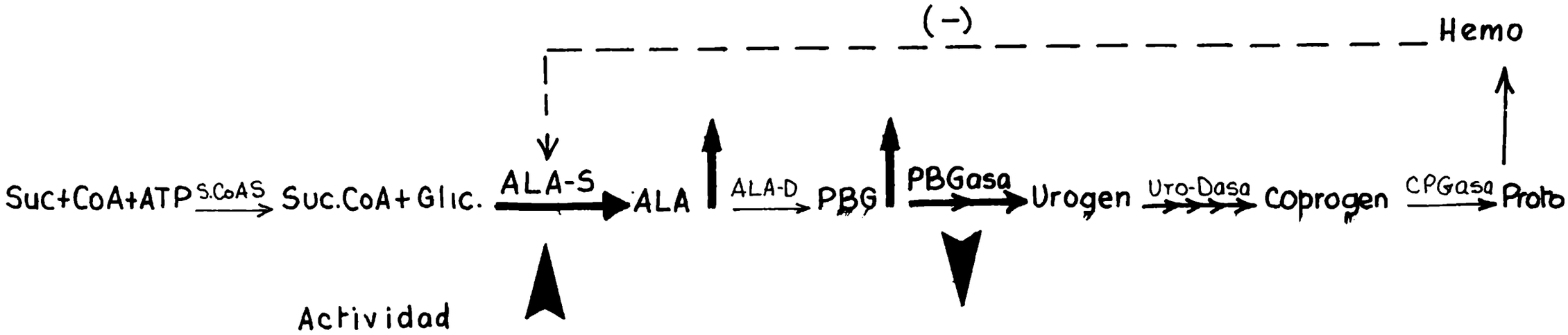


Figura 43: Probable relación, entre la reducción de la actividad de Deaminasa y el aumento del ALA-Sintetasa en la Porfiria Aguda Intermitente.

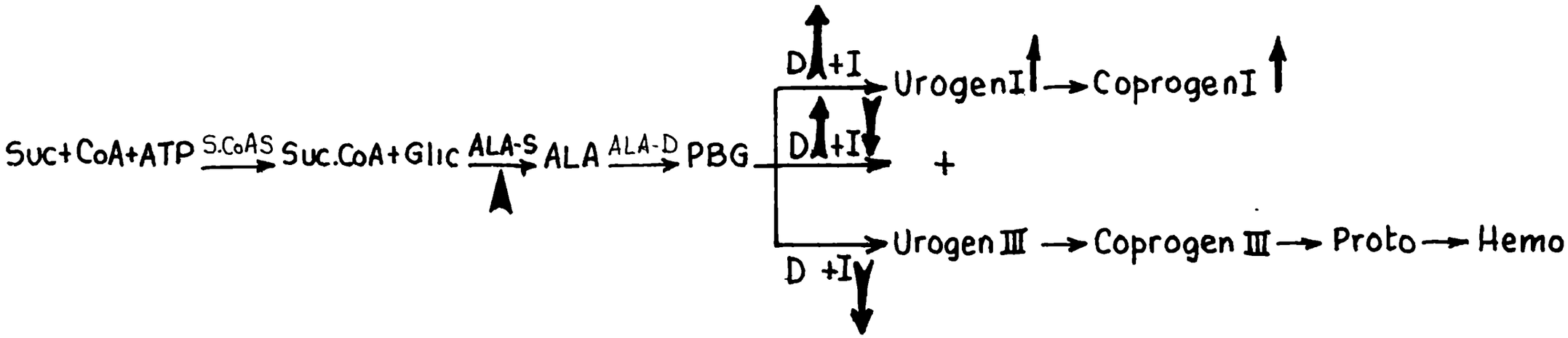


Figura 44: Mecanismos probablemente responsables del patrón de excreción anormal de isómeros del tipo I en la Porfiria Congénita Eritropyética.

nos, era intermedia entre los valores obtenidos para los controles normales y los pacientes afectados (Romeo et al, 1970 a) y con las observaciones de que cultivos in vitro de fibroblastos de pacientes porfíricos, contenían mucho menos Isomerasa que cultivos de células similares provenientes de controles normales (Romeo et al, 1970 b).

Esta última evidencia también estaba indicando que si como se suponía la deficiencia enzimática estaba determinada genéticamente, debía extenderse y detectarse en todos aquellos tejidos en los cuales la enzima es normalmente activa. Por consiguiente, es muy probable que la Isomerasa se encuentre disminuída en todos los tejidos porfíricos, si bien sólo en médula ósea la velocidad de síntesis de porfirinas es lo suficientemente alta como para exceder la capacidad de la Isomerasa reducida y conducir entonces a la formación de porfirinógenos de la serie I; ésta es quizás la razón por la cual el defecto metabólico en la PCE, se expresa sólo o más sensiblemente en el tejido eritropoyético, aún cuando la lesión enzimática puede ocurrir en todos los tejidos.

Es igualmente interesante agregar que Levin y Flyger (1971) han demostrado que la actividad de Isomerasa en hemolizados y extractos de distintos tejidos de ardillas rojas (Sciurus niger) es mucho menor que en preparaciones similares obtenidas de ardillas grises (Sciurus carolinensis). Los huesos de las ardillas rojas son rosados y fluorescentes debido a la acumulación de Uroporfirina I. La formación, depósito y excreción de la Uroporfirina I por ardillas rojas sanas, se asemeja a las manifestaciones bioquímicas de la PCE y por cuanto el defecto enzimático en el camino del hemo es el mismo en el ganado porfírico y en humanos, así como en Sciurus niger, los miembros de estas especies proveen un pequeño y económico modelo animal para el estudio experimental de esta enfermedad (Flyger, 1977).

La segunda hipótesis postulaba que la lesión básica en PCE es un aumento de la actividad de la Deaminasa que produciría cantidades excesivas de un intermediario normalmente convertido en Uroporfirinógeno III por la Isomerasa, de acuerdo a la teoría original de Bogorad (1963) (Figura 18). Esta posibilidad podría conciliarse con las observaciones de Levin, suponiendo que un gran incremento de ese intermediario polipirrólico excedería la capacidad de la Isomerasa y formaría Uroporfirinógeno I espontáneamente; de esta manera podría también explicarse la acumulación de porfirinas de las series I y III en PCE, encontradas por Heilmayer et al (1963) y Miyagi et al (1976). Masuya (1969) y Miyagi et al (1976) han reportado que la actividad de la Deaminasa era superior en sangre de pacientes porfíricos comparada con sujetos normales, en apoyo de esta segunda hipótesis.

Finalmente, llevando a cabo estudios comparativos con toros normales y un toro con PCE, de biosíntesis de porfirinas a partir de precursores, en diferentes tejidos, y de la determinación directa de la actividad catalítica de varias de las enzimas del hemo, se encontró que en médula ósea, se encuentra

significativamente aumentada la actividad de la Deaminasa y correlativamente la Isomerasa ligeramente reducida, al mismo tiempo los niveles de ALA-S son muchas veces superiores en el animal porfírico comparado con los normales. En los demás tejidos la expresión de la falla es en general análoga en cuanto a la enzima limitante, si bien la PBGasa está disminuída, en base a estos resultados se habría postulado la tercera hipótesis, válida por lo menos en el caso de PCE del animal estudiado (Batlle et al, 1978 a, b).

En 1973, Rimington y With, Hoftad et al, y Eriksen et al, describieron el primer caso de PCE humano encontrado en Escandinavia. Es interesante que el patrón de excreción de porfirinas en ese paciente era muy diferente en varios aspectos al correspondiente a una clásica PCE. Más del 50% de las porfirinas excretadas en la orina eran isómeros del tipo III, lo cual parecería excluir la posibilidad de que una disminución de la actividad de Isomerasa constituyera la falla dominante en este caso. Es probable entonces, que los autores tuvieran en sus manos un nuevo tipo de PCE, distinto del descripto clásicamente.

En consecuencia, las evidencias experimentales nos están indicando ahora que la PCE es fenotipicamente homogénea en la mayoría de sus aspectos; pero genéticamente heterogénea, es decir que el error innato en la biosíntesis de porfirinas puede varias entre tipos diferentes de PCE (Hofstad et al, 1973).

Sindrome de Dubin-Johnson: La excreción total de coproporfirina en pacientes con SDJ, excede en un 30-40% la de controles normales, aunque este aumento es mucho menor que el hallado para una PCE; este fenómeno, está acompañado de una distribución anormal de los isómeros de la coproporfirina, observándose un marcado aumento del isómero de tipo I, concomitantemente con una disminución del isómero normal tipo III (Loskelo et al, 1967; Ben-Ezzer et al,1971; Wolkoff et al, 1973, Kondo et al, 1974, 1975, 1976a, b). Ben-Ezzer et al, 1971, postularon que la causa de esa relación invertida de los isómeros I y III de la Coproporfirina urinaria podría atribuirse a una deficiencia o inhibición de la Isomerasa hepática, en analogía a la hipótesis de Levin (1968) para la PCE. Wolkoff et al (1973) especularon aún más proponiendo que una deficiencia de la Isomerasa en pacientes con SDJ, podría llevar a una formación disminuída de hemo en hígado. Esto haría suponer un aumento del ALA-S, a través de una falla en su control. Sin embargo, en los pacientes con SDJ, no se han observado hasta ahora síntomas característicos de porfiria, ni tampoco se habían medido las actividades de ALA-S o Isomerasa. Por otro lado, la administración griseofulvina en dosis que se sabe precipitan ataques de porfiria aguda en sujetos susceptibles, a pacientes y carrier del SDJ, no produjo signos clínicos algunos de porfiria en estos últimos, en tanto que el porcentajes de Coproporfirina I y la concentración urinaria total de Coproporfirinas tampoco varió (Kondo et al, 1976 a, b). Con el objeto de obtener una evidencia directa acerca de la posible deficiencia de Isomerasa, Shimizy et al (1977) determinaron la actividad de

esta enzima en hemolizados de eritrocitos de 5 pacientes con SDJ y 4 controles y en homogenatos de biopsias de hígado de 4 pacientes y 4 normales. Estos autores no encontraron diferencias significativas en la actividad de la Isomerasa entre ambos grupos ni en los lisados de sangre, ni en los homogenatos, sugiriendo que el bajo contenido de Coproporfirina III y alto del isómero I, no se debe a una falla en esta enzima, en el hígado o en el sistema eritropoyético y además que la aberración metabólica en el SDJ podría residir no en la producción de Uroporfirinógeno III sino en su transporte. Si bien los resultados de Shimizu et al (1977) parecen eliminar la participación de la Isomerasa como factor responsable de la anormal excreción urinaria de Coproporfirina I, la metodología empleada es dificultosa y no siempre reproducible, de manera que habría que aportar mayores evidencias experimentales para aclarar esta situación que está muy lejos de haberse dilucidado; tan sólo nos encontramos en los comienzos de la discusión.

Intoxicación con plomo: Uno de los efectos más conocidos del plomo sobre el camino del hemo, es la significativa inhibición del ALA-D, aunque hay otras etapas como la catalizada por el ALA-S, CPGasa y ferroquelatasa que también sufren un bloqueo parcial por acción de este metal. Por otro lado es notable que durante la intoxicación por plomo, también se observa un incremento en la excreción urinaria de PBG; esto puede deberse a una inhibición de la conversión del monopirrol en Uroporfirinógeno, que conduciría entonces a una acumulación de PBG y finalmente a un aumento de su eliminación por orina. Se ha demostrado que el plo inhibe no completamente la Deaminasa de eritrocitos de ratas y humanas, pero no presenta la misma acción sobre la Deaminasa de hígado de igual origen, (Piper Tephly, 1974); (Tephly, 1975). Se determinó que este comportamiento diferencial de las Deaminasas de hígado y eritrocitos se debía a la presencia en hígado,de un factor dializable, de bajo peso molecular, alrededor de 8000, termoestable, que protegía a la enzima de la inhibición por el plomo y era también capaz de revertir la inactivación de la Deaminasa por ese metal. Esta sustancia se encontró asimismo en otro tejido como corazón; y se ha propoesto que debe cumplir un papel importante en la regulación de la biosíntesis del hemo y dela actividad de la Deaminasa (Tephly, 1975). Más recientemente, Piper y van Lier (1977) han demostrado que además de proteger la Deaminasa de los efectos del Pb, este factor estimula la actividad enzimática y ambos fenómenos son específicos para esta enzima proponiéndose que podría funcionar como una coenzima de la Deaminasa.

Porfiria Cutánea Tarda: Esta porfiria se caracteriza por una significativa acumulación y excreción de porfirinas altamente carboxiladas, en particular Uroporfirinas; a raíz de una falla a nivel de la enzima Uroporfirinógeno Decarboxilasa. Pero es llamativo también el hecho de que un alto porcentaje (50-60%) de las Uroporfirinas excretadas o bien de las sintetizadas in vitro a partir de precursores por distintos tejidos de pacientes con PCT, corresponde a la serie isomérica I; por lo cual se ha sugerido que es probable que en la PCT, además

de la deficiencia de la Decarboxilasa, existe también una falla en el componente Isomerasa de la PBGasa (Batlle et al, 1978). Si bien esta hipótesis requiere indudablemente mayores evidencias experimentales que la apoyen o modifiquen, también constituye un nuevo estímulo para la investigación de la conversión enzimática del PBG en Uroporfirinógenos, en otro de los conocidos desórdenes del metabolismo del hemo.

V'.5.- DECARBOXILASAS

V'.5.1.- Propiedades y mecanismo:

La etapa siguiente en el camino biosintético del hemo involucra la decarboxilación de las cuatro cadenas laterales de ácido acético, del Uroporfirinógeno, a los cuatro restos metilos del Coproporfirinógeno. Esta reacción es catalizada por la Decarboxilasa o Uroporfirinógeno-carboxiliasa (Figura 42).

Durante la formación enzimática de Coproporfirinógeno, a partir de Uroporfirinógeno III o I, se detecta la presencia de intermediarios con 7, 6 y 5 carboxilos, estos resultados sugieren que el proceso se lleva a cabo en etapas; sin embargo, hasta el momento, sólo se ha aislado una sola proteína responsable de la decarboxilación del porfirinógeno octacarboxílico en el tetracarboxílico; que no se ha podido desdoblar en subunidades o en más de una enzima, postulándose entonces que la Decarboxilasa es una única proteína, que posee posiblemente, dos o más sitios activos y actúa en forma secuencial sobre su sustrato.

Existen varios hechos experimentales que apoyan la teoría de que la decarboxilación de los Uroporfirinógenos es un proceso en etapas. Desde mucho tiempo atrás se había observado que por ejemplo, de la orina de pacientes con Porfiria Cutánea Tarda, se podían aislar porfirinas con número de carboxilos intermedios 7, 6, 5. Además, ya en 1962, Batlle y colaboradores (1962), además de identificar la porfirina heptacarboxílica biosintética con la aislada de orinas de igual número de carboxilos, proponiendo denominarla Firiaporfirina; demostraron por marcación directa con C^{14} y por dilución isotópica que el porfirinógeno de 7 carboxilos era un intermediario en este camino biosintético, entre el Uroporfirinógeno y el Coproporfirinógeno.

En la mayoría de los tejidos, la Decarboxilasa es una enzima citoplasmática. Actúa muy específicamente sobre los restos acético, pero no es ten específica en cuanto al tipo isomérico, ya que es capaz de decarboxilar los 4 isómeros posibles del Uroporfirinógeno, aunque con diferente velocidad, III > IV > II > I. También digamos que puede actuar sobre los distintos isómeros de los demás porfirinógenos con 7, 6 y 5 carboxilos.

Es una enzima particularmente anaeróbica, de manera que el oxígeno la inhibe significativamente, aunque se ha propuesto que la acción del oxígeno, se debe a una oxidación de sus sustratos, los porfirinógenos, si bien no puede descartarse además un efecto directo sobre la enzima misma.

Es bastante termolábil y sulfhidrílica, activándose o protegiéndose por medio de β-mercaptoetanol y GSH. Lógicamente la inhiben los metales pesados y bloqueantes de restos -SH.

En cuanto a la forma de acción de la Decarboxilasa, todavía no ha podido dilucidarse el mecanismo mismo de la reacción de decarboxilación del resto acetato a metilo; sólo se ha conseguido establecer, cuál es la ruta de decarboxilación del Uroporfirinógeno III al Coproporfirinógeno III; lo cual ha constituído de por sí, un problema sumamente complejo, pues en teoría, por sucesivas decarboxilaciones de las 4 cadenas acetato a las 4 metilo, podrían formarse 4 porfirinas heptacarboxílicas, seis hexacarboxílicas y 4 pentacarboxílicas. De allí, que podrían existir 24 rutas posibles. Como resultado de una estrecha colaboración entre nuestro grupo de investigación en Buenos Aires y el del Profesor Jackson, en Inglaterra, se lograron sintetizar todos los intermediarios y establecer cuál, entre las 24 posibles, era la ruta natural (Jackson, Sancovich, Ferramola, Evans, Games, Matlin, Elder y Smith, 1976). Según estos autores, la decarboxilación tiene lugar de manera tal, que el sustrato, Uroporfirinógeno III, se ubicaría sobre la enzima, iniciándose la reacción sobre el resto acetato del anillo D, procediendo luego sobre los restos acetato de los anillos A, B y C, hasta formar el Coproporfirinógeno III (Figura 46). Es decir, todo sucedería, como si el Uroporfirinógeno III se desplazara o quizás rodara, sobre la superficie de la enzima, en el sentido de las agujas del reloj.

En contraste a lo que ocurre con la ruta ordenada en el sentido de las agujas del reloj en la decarboxilación enzimática del Uroporfirinógeno III, catalizada por la Decarboxilasa; esta misma enzima actúa sobre el Uroporfirinógeno I convirtiéndolo en Coproporfirinógeno I por las dos únicas rutas posibles; es decir, la decarboxilación de los isómeros tipo I tiene lugar por una ruta no específica (Figura 47) (Jackson, Nagaraja, Supphayen y Smith, 1977).

V.5.2.- Rol de la decarboxilasa en el camino de las porfirinas:

Dijimos antes, que entre las observaciones experimentales que sugerían que esta reacción enzimática era un proceso en etapas, se encontraba el hecho de que las orinas de pacientes con Porfiria Cutánea Tarda, se caracterizaban por la presencia de elevadas cantidades de Porfirinas con 8, 7, 6, 5 y 4 carboxilos, pero particularmente Uro y Firiaporfirina. Este cuadro anormal puede ser la consecuencia de una falla en el control del camino de síntesis y de un bloqueo a nivel de la etapa de decarboxilación.

V.6.- COPROPORFIRINOGENASA

V.6.1.- Propiedades y mecanismo:

La conversión del Coproporfirinógeno III en Protoporfirinógeno IX es catalizada por la Coproporfirinogenasa (CPGasa) o Coproporfirinógeno-Decarboxilasa o Coproporfirinógeno-Oxidasa o Coprogenasa. Esta transformación implica una decarboxilación oxidativa de los dos restos de ácido propiónico situados en las posiciones 2 y 4 de los anillos A y B del Coproporfirinógeno III a dos restos vinilo (Figura 12).

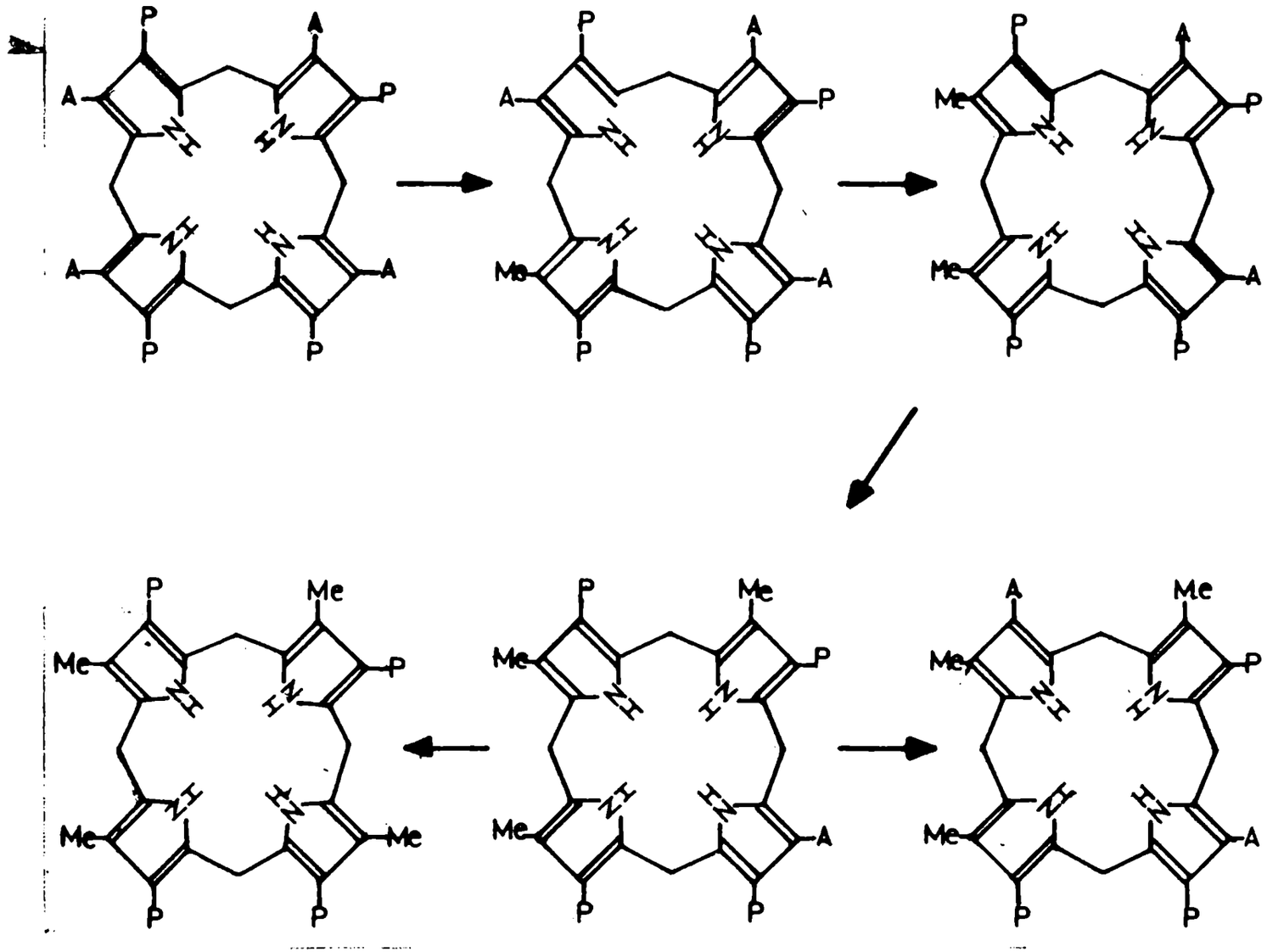


Figura 46: Ruta normal para la decarboxilación enzimática del Uroporfirinógeno III en Coproporfirinógeno III, en el sentido de las agujas del reloj, iniciándose sobre el anillo D del ciclo tetrapirrólico

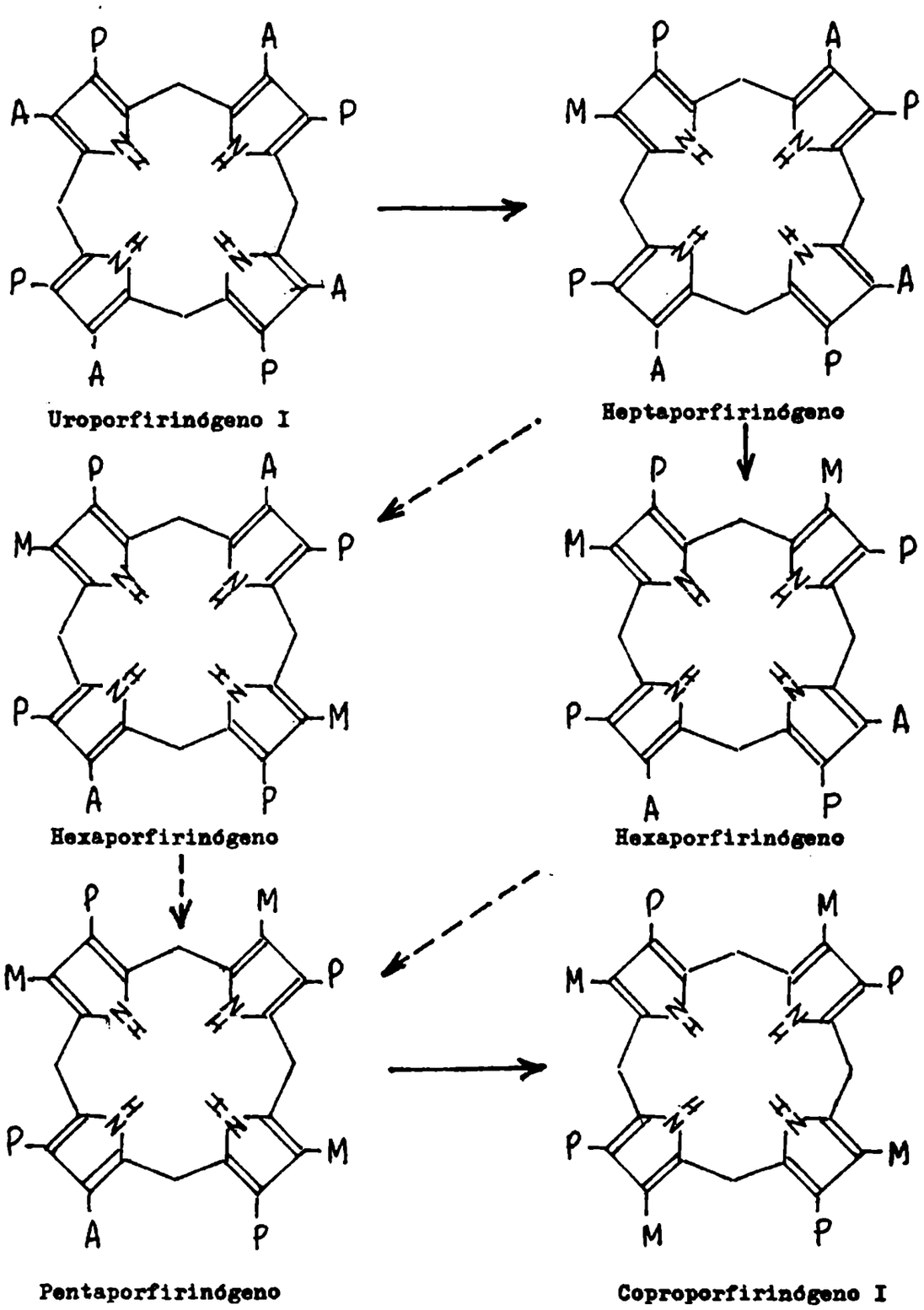


Figura 47: Rutas alternativas y simultáneas para la decarboxilación enzimática del Uroporfirinógeno I en Coproporfirinógeno I

Esta enzima ha sido aislada de varias fuentes y purificada en algunos casos, un gran número de propiedades se han determinado con la enzima purificada proveniente de hígado de rata (Batlle, Benson y Rimington, 1965).

En todos los casos estudiados se trata de una enzima mitocondrial y tiene un requerimiento absoluto por el oxígeno molecular. Sin embargo en ciertos organismos estrictamente anaeróbicos debe existir algún otro mecanismo que actúe como aceptor de hidrógenos, y de estudios de Tait (1972) realizados con Rh. spheroides, este autor ha propuesto que en esos casos el aceptor estaría constituído por ATP, L-metionina y Mg^{++}.

La enzima es altamente específica para el Coproporfirinógeno III, de allí que en las células vivientes sólo se encuentre Protoporfirina IX. No emplea Coproporfirinógeno I ni II, como sustratos, pero sí puede utilizar al isómero IV, que de todas formas no es natural y conduce a la formación de la Protoporfirina XIII (Al-Hazimi, Jackson, Ryder, Elder y Smith, 1976).

En base a la determinación de las estructuras de porfirinas obtenidas de materiales biológicos y a la síntesis química de posibles intermediarios entre el Coproporfirinógeno III y el Protoporfirinógeno IX, se han postulado varios mecanismos de reacción para esta enzima.

Recordemos que a partir de fuentes diversas, naturales y biosintéticas, se ha aislado una porfirina tricarboxílica, cuya estructura, confirmada por síntesis química, es un derivado de la Coproporfirina III, pero con un resto vinilo en la posición 2 del anillo A (Kennedy, Jackson, Kenner y Suckling, 1970a, 1970b). Lo cual estaría indicando que la decarboxilación oxidativa de los restos propionato es también un proceso en etapas y comenzaría por el anillo A; lo cual fue luego confirmado empleando análogos sintéticos (Games, Jackson y Jackson, 1976), siguiendo además, como en el caso de la Decarboxilasa, el sentido de las agujas del reloj.

Rimington y Tooth (1961) habían postulado que una acrílico porfirina podría ser el intermediario en la reacción; sin embargo el isómero trans de la 2-4 diacrílico deuteroporfirina no actuó como sustrato, aunque restaba la posibilidad de que el verdadero intermediario fuera el isómero cis (Batlle, Benson y Rimington, 1965) y en 1970, Rimington y colaboradores (French, Nicholson y Rimington, 1970), aislaron, de materiales biológicos, la Porfirina S-411, cuya estructura respondía a la de una porfirina tricarboxílica derivada de la Coproporfirina III, con un sustituyente cis-acrilato en la posición 2 del anillo A, lo cual apoyaba la teoría anterior.

En 1965, Batlle y Rimington, propusieron además que la primera etapa en este proceso era una oxidación del resto propionato a un -OH-propionato (Figura 48) y en 1966, Sano, sintetizó una mezcla de isómeros de este compuesto, demostrando su incorporación en Protoporfirina por acción de la CP Gasa.

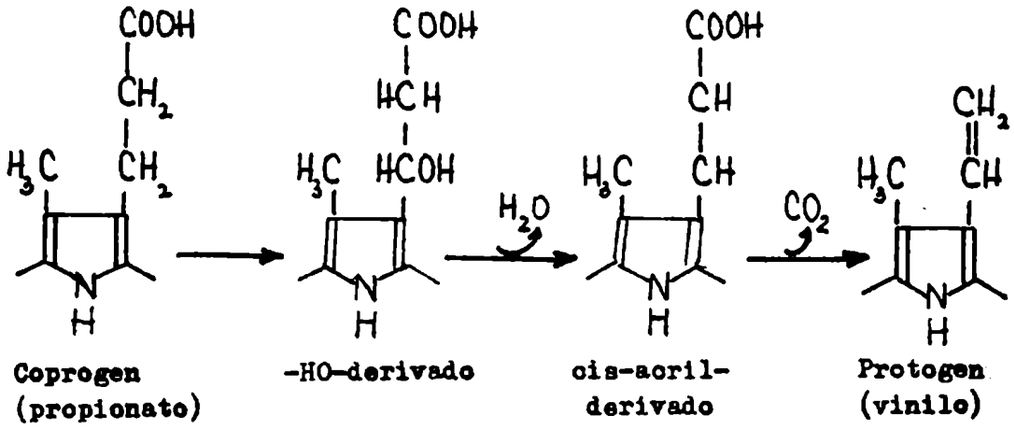


Figura 48: Mecanismo de decarboxilación del Coproporfirinógeno III en Protoporfirinógeno IX

Sin embargo estudios posteriores (Zaman, Abbond y Akhtar, 1972), empleando ciertos precursores marcados específicamente, parecerían indicar que la Porfirina S-411 no sería un intermediario normal; pero Jackson y colaboradores (1976) interpretan estos resultados, sugiriendo, primero que la S-411 podría provenir de un camino anormal y que el α-OH-propionil derivado podría eliminar agua y decarboxilarse simultáneamente a vinilo. Sin embargo, no puede descartarse, que bajo control enzimático, la ruta esquematizada en la Figura 48 sea la real. Recientes estudios cinéticos, empleando preparaciones crudas y purificadas de CPGasa de distintas fuentes, han aportado evidencias acerca de la formación de intermediarios hidroxilados, derivados del Coproporfirinógeno III (Batlle, Jackson, Lash y Smith, trabajo no publicado).

V.6.2.- Rol de la CPGasa en el camino de las porfirinas:

Recordemos que una de las características bioquímicas de la intoxicación por plomo era, una elevada excreción de ALA y Coproporfirina. Existen además otros tipos de Porfirias, denominadas genéricamente Coproporfirias, hepática y eritropoiética, que también exhiben niveles urinarios significativamente incrementados de Coproporfirina. En todos estos casos, se desprende que es natural una investigación de la actividad de la CPGasa.

V.7.- PROTOPORFIRINOGENO OXIDASA

V.7.1.- Propiedades:

La consideración de la existencia de una Protoporfirinógeno IX Oxidasa o Protogen Oxidasa en el camino de los tetrapirroles, es de muy reciente data, y al mismo tiempo de ubicuidad muy limitada.

Esta enzima cataliza la deshidrogenación del Protoporfirinógeno IX a Protoporfirina IX, por pérdida de 6 átomos de H.

En 1973, Poulson y Polglase postularon que un pigmento, detectado en S. cerevisiae, que presentaba una típica banda de absorción en el espectro visible a 503 nm, por lo cual fuera designado P-503, era un posible intermediario en la biosíntesis de Protoporfirina IX.

Ya en 1967, Labbe y colaboradores (Labbe, Volland y Chaix, 1967), también habían reportado en S. cerevisiae, la presencia de un pigmento que por su espectro de absorción y reacciones químicas se comportaba como una tetrahidroporfirina, que podía provenir de la reducción de la Protoporfirina IX o auto-oxidación del Protoporfirinógeno IX.

Poulson y colaboradores (Kamitakahara, Pearlstone, Poulson y Polglase, 1973), identificaron finalmente al P-503 como una Proto-tetrahidroporfirina IX y más recientemente, Poulson y Polglase (1975) han reportado la extracción y purificación de la enzima a partir de S. cerevisiae, ésta se encuentra en la fracción mitoconfrial, es sulfhidrílica y no utiliza como sustratos al Coproporfirinógeno I ni III, tampoco al Uroporfirinógeno I o III.

V.7.2.- Rol de la Protogen oxidasa en el camino de las porfirinas:

La Protogen Oxidasa podría también estar ligada a alguno de los disturbios del metabolismo del hemo, en los cuales haya una acumulación de Protoporfirina, habiéndose postulado que sería la enzima deficiente en los casos de Porfiria Variegata (Smith, Jackson y Jackson, 1976).

V.8.- FERROQUELATASA

V.8.1.- Propiedades:

La inserción del hierro en las distintas porfirinas, particularmente la Protoporfirina IX, da lugar a la formación de los hemos, con la consecuente pérdida de dos protones. La enzima que cataliza este proceso se conoce como Hemo-Sintetasa o Proto-Hemo-ferro-liasa o Ferroquelatasa, nombre sugerido por Rimington en 1958 y empleado por la mayoría de los investigadores.

Es otra enzima particulada, ubicada en la mitocondria de células animales, cloroplastos de vegetales o cromatóforos de bacterias fotosintéticas.

Respecto a su especificidad, es absolutamente específica por el hierro, lo cual es muy significativo, por cuanto in vivo, la enzima, frente a una posible serie de cationes divalentes, debe seleccionar al hierro entre todos ellos. En cuanto a las porfirinas, además de la Protoporfirina, meso y deuteroporfirina pueden funcionar como sustratos, pero en la célula, sólo protoporfirina se encontrará disponible. Se ha postulado que la enzima posee dos sitios activos, uno para el metal y otro para la porfirina; además, que la enzima activa es una lipoproteína, ya que el agregado de ciertos solventes orgánicos o fracciones lipoicas aumentan su actividad, probablemente facilitando el acceso del sustrato al centro activo.

Es sulfhidrílica y parece requerir fosfato de piridoxal, que estaría fuertemente unido a la proteína.

V.8.2.- Rol de la Ferroquelatasa en el camino de las porfirinas:

En aquellos casos de Porfirias caracterizados por una acumulación de Protoporfirina, es de esperar que las razones de este disturbio sean una falla a nivel de la formación y/o utilización de este compuesto, y lo más lógico sería buscar un bloqueo en la etapa de la quelatasa.

"La Regulación de la biosíntesis del hemo en los mamíferos es compleja e intrincada y se necesita poca imaginación para apreciar cuántas piezas deben ajustarse en el mosaico de este complejo sistema para su normal función fisiológica."

Thomas R. Tephly (Norteamericano)
(Freiburg, 1975).

VI.- REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS

VI.1.- MANIFESTACIONES DE LOS MECANISMOS DE REGULACION

En contraste con la gran importancia biológica de los hemos, no se conoce otro rol fisiológico para las porfirinas libres y sus precursores específicos ALA y PBG, más que el de productos intermedios en el camino biosintético del hemo, y en condiciones normales, la cantidad de estos compuestos que se acumulan o excreta es muy pequeña (Tabla IV). Esto indica claramente, que esta biosíntesis se lleva a cabo con un alto grado de eficiencia. No solamente la conversión enzimática del PBG en porfirinas favorece la formación de los isómeros fisiológicos de la serie III al grado del 99,9%, sino que, de la producción diaria de 460 umoles de Hemoglobina, solamente se excretan, entre precursores y porfirinas entre 20 - 24 umoles, es decir aproximadamente apenas un 5%. Este notable rendimiento es el resultado de la existencia de una serie estrechamente ligada de controles; sin embargo, si estos controles fallaran o fueran defectuosos, como ocurre en las Porfirias, puede tener lugar la síntesis de elevadas cantidades de intermediarios de la cadena del Hemo, con serias consecuencias para el organismo todo.

Tabla IV: Acumulación de precursores y porfirinas en el hombre, bajo condiciones normales y anormales.

Principal derivado tetrapirrólico	Velocidad de síntesis	Precursores y Porfirinas			
Hemoglobina 900 g (53 nmoles Hemo) / 70 Kg peso	460 umoles / día	Excreción Urinaria umoles / día	Normal	ALA	20
				PBG	2-4
				Uro	0,03
				Copro	0,15
			Porfiria Aguda Intermit	ALA	260-400
				PBG	310-450

La alta concentración de precursores y/o intermediarios que puede alcanzarse cuando fallan los mecanismos de regulación, demuestran la gran capacidad potencial de trabajo de las enzimas del camino del hemo, cuando pueden funcionar libremente, y enfatizan la necesidad de la existencia de sistemas de control en favor de la economía y salud de la célula.

Una situación análoga se presenta por ejemplo en los organismos fotosintéticos que deben sintetizar derivados de Hemo y Clorofila, en los cuales, la concentración de este último pigmento es cien veces mayor que la del Hemo. Esto implica que necesariamente deben funcionar mecanismos regulatorios capaces de mantener un flujo del intermediario común, la protoporfirina, diversificado luego hacia los diferentes productos finales a la velocidad apropiada. Aparentemente las ramas del hierro y del magnesio, están controladas independientemente aunque inter-relacionadas, por cuanto bajo ciertas circunstancias, se puede reprimir la síntesis de clorofila, sin afectar la síntesis del Hemo.

La síntesis de derivados de tetrapirroles funcionales, en animales, plantas y bacterias está influenciada significativamente por el medio ambiente. Por ejemplo, la presión de oxígeno afecta sensiblemente la síntesis de Hemoglobina en vertebrados; de manera que se incrementa a valores del orden de 23 g HB/100ml de sangre a elevadas altitudes donde la tensión de oxígeno es baja; mientras que a nivel del mar está dentro de los 16 g HB/100ml de sangre.

En plantas y bacterias fotosintéticas la intensidad luminosa también juega un papel importante en la biosíntesis de clorofila.

VI.2.- MECANISMOS DE CONTROL

Se han postulado direrentes mecanismos que pueden controlar la biosíntesis de porfirinas, i) Control a través de cambios en la actividad enzimática, ii) Control a través de cambios en la cantidad de enzima sintetizada, iii) Control por localización celular y tisular, iv) Control por efectos de constituyentes del medio ambiente o del medio celular, oxígeno, luz, estado de óxido-reducción intracelular, v) Control por inter-conección con otros caminos metabólicos relacionados.

Los dos primeros mecanismos están muy vinculados, de manera que vamos a considerarlos simultáneamente.

VI.2.1.- Control por retro-inhibición y por represión enzimática del ALA-S:

El mayor logro hacia un mejor entendimiento de la regulación de la biosíntesis del Hemo, ha sido el establecimiento de que la síntesis de los tetrapirroles está controlada principalmente, por cambios en la actividad de la enzima ALA-S, considerada como la primer enzima de este camino metabólico. Es decir, la cantidad de Hemo sintetizada depende de la actividad del ALA-S presente. El ALA-S es así, la enzima limitante y como tal, juega el papel fundamental en la regulación de esta secuencia biosintética. En la mayoría de las células estudiadas, las demás enzimas se encuentran presentes en cantidades no limitantes.

Hay dos mecanismos por los cuales puede controlarse la cantidad de Hemo formado a través de la enzima ALA-S: uno involucra cambios en su actividad y el otro, cambios en la cantidad de enzima presente.

VI.2.2.- Control por cambios en la actividad del ALA-S:

Hay varios mecanismos que pueden funcionar en la célula para controlar la actividad de una enzima. Un método de control es a través de la asociación o disociación de las subunidades de una enzima oligomérica, que pueden estar unidas por medio de enlaces no-covalentes. Un segundo método que implica cambios más drásticos en la estructura de una enzima, es el que ocurre con la activación de los zimógenos, por eliminación enzimática de una parte de la cadena polipeptídica. Finalmente, en un gran número de procesos enzimáticos, se ha encontrado que el producto final de una secuencia metabólica, ejerce un efecto inhibitotio sobre la primer enzima de ese camino. Este tipo de control se conoce como 'control por feed-back' o control por retro-inhibición o control por porducto final. Como resultado del trabajo de muchos investigadores, las evidencias experimentales establecen que este último tipo de control, el de retro-inhibición, es el mecanismo de control que opera en la biosíntesis del Hemo. La primera prueba del funcionamiento de este mecanismo provino de los estudios de Lascelles (1964), quien demostró que cuando Rh. spheroides se hacían crecer en un medio deficiente en hierro, se acumulaban grandes cantidades de Coproporfirina. El agregado de pequeñas cantidades del metal corregía el problema, postulándose que el hierro actuaba promoviendo la síntesis del producto final en la secuencia metabólica - el Hemo - que a su vez actuaba inhibiendo la actividad de la primer enzima en esa secuencia, el ALA-S (Figura 49.1). Esta hipótesis fue confirmada cuando se encontró que cantidades tan bajas como 0,1 umolar de Hemo o Hemina eran capaces de provocar una marcada y específica inhibición del ALA-S, no sólo en Rh. apheroides, sino también sobre la Sintetasa obtenida de otros tejidos. De manera, que uno de los mecanismos rápidos de control de la biosíntesis del Hemo, es a través de una inhibición por el Hemo, es decir el producto final, sobre la primera enzima del camino, el ALA-S. Se acepta que una inhibición similar por feed-back negativo, opera en el hombre, y explicaría por ejemplo, la acumulación de porfirinas en eritrocitos, en la anemia por deficiencia de hierro.

VI.2.3.- Control por cambios en la cantidad de ALA-S:

Además de la inhibición por producto final, se ha demostrado que muchos sistemas son sensibles a control por represión. En este caso, un control genético de la síntesis de ALA-S, dependiente de DNA, regula el nivel de ALA-S en la célula. El mecanismo que se ha postulado para explicar la síntesis del ALA-S y su control, se basa en la conocida hipótesis de Jacob-Monod (Figura 49.2).

En este esquema se tiene en cuenta, en particular el hecho experimental de que la síntesis de Hemo se encuentra reprimida en la mayoría de los tejidos, por cuanto sus requerimientos son generalmente bajos, y además, que el mismo Hemo, actúa como represor de su propia síntesis.

El Gen estructural, una porción del DNA cromosómico, del operón Hemo, que lleva la información para la síntesis del ALA-S, se activa por medio de un Gen operador, que a su vez responde a la presencia de un represor activo, el

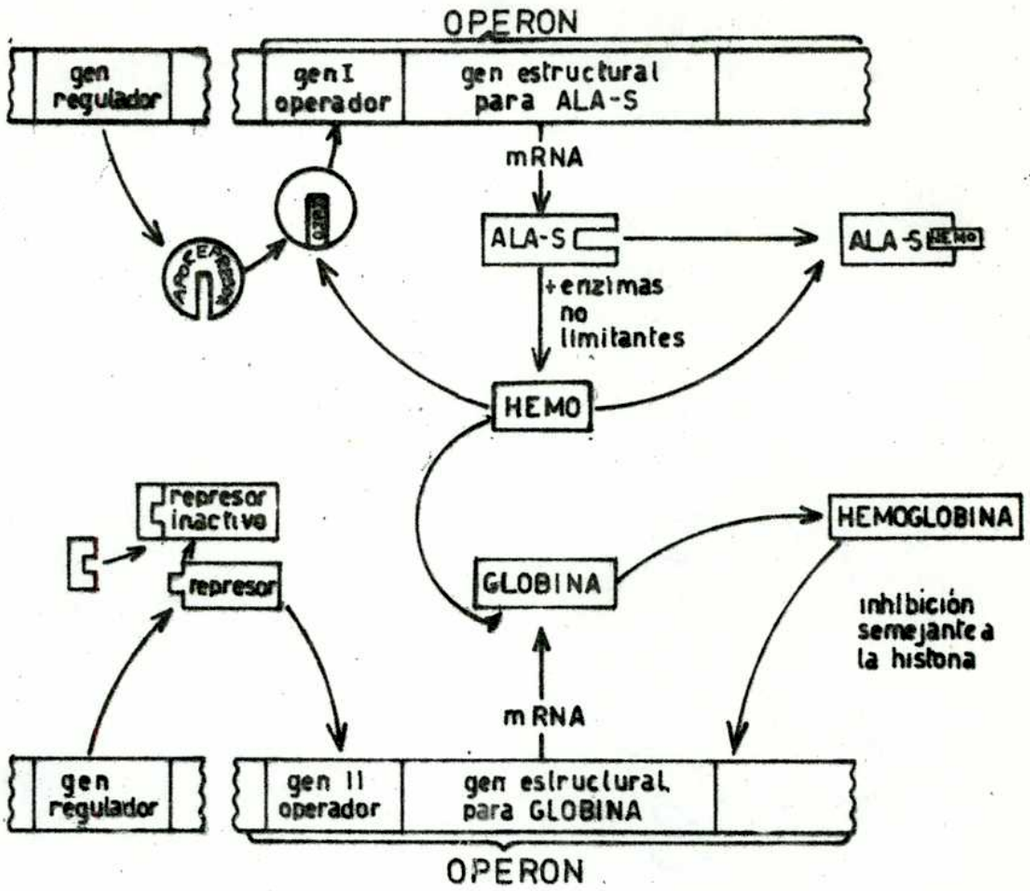


Figura 49: Esquema postulado para el mecanismo de regulación de la biosíntesis del hemo y su coordinación con un hipotético esquema de control de la síntesis de globina y Hemoglobina.

cual actúa normalmente, reprimiendo este Gen operador, que detiene entonces la producción del RNA-mensajero, por el Gen estructural que codifica la enzima y por ende se interrumpe su síntesis. Este mecanismo de represión de síntesis enzimática, constituye un sistema de control lento.

El represor activo se forma por la unión de un apo-represor proteico, producido por el Gen estructural del operón Hemo y un co-represor, que en este caso se propone que es la molécula del Hemo.

De manera que el Hemo, controla su propia síntesis, actuando, rápidamente por un mecanismo feed-back inhibiendo la actividad del ALA-S y, más lentamente, por un mecanismo de represión, deteniendo la síntesis proteica del ALA-S. Cuando no hay exceso de Hemo, no tiene lugar la conjugación del mismo con el apo-represor, el sistema represor no es activo, y por lo tanto no actúa sobre el Gen operador, de manera que se dispara o recomienza la síntesis de ALA-S, que tendrá lugar a máxima velocidad. Este mecanismo de control genético de la biosíntesis del Hemo por represión, ha sido demostrado en varios tejidos; así se ha encontrado que en cultivos en crecimiento de Rh. spheroides, el agregado de concentraciones de Hemina del orden de 10 umolar, reprime completamente la síntesis del ALA-S y se acepta asimismo que un mecanismo análogo opera en organismos superiores (Rimington, 1966).

Antes de considerar otros posibles mecanismos de control de este camino metabólico, digamos que la utilización del Hemo para la síntesis de las distintas Hemoproteínas, debe encontrarse, de alguna manera, muy bien coordinada con la formación de sus componentes proteicos específicos, y basándonos en los hechos precedentes, es posible proponer un esquema, que explique los mecanismos de control que operan, por ejemplo, en la síntesis de la Hemoglobina en las células eritropoiéticas. El monómero de la Hemoglobina contiene Hemo y Globina en la relación 1:1. Estudios efectuados acerca de la síntesis de Globina y Hemo en reticulocitos y médula de conejo, han demostrado que existe un paralelismo entre ambas; comprobándose que un exceso de Hemo, inhibe su propia síntesis por los mecanismos ya descriptos; pero por otro lado estimula la síntesis de Globina.

Se postula (Figura 49) que la entrada de sustancias efectoras en las células eritroides, posiblemente eritropoietina o metabolitos de células vecinas, o aún el mismo Hemo, transforman el represor activo, en un represor incapaz de ejercer su acción sobre el Gen operador de la Globina, y en consecuencia comienza la síntesis de Globina, que utiliza el Hemo libre disponible para la formación de la Hemoglobina. Como resultado de esta conjugación, queda menos Hemo disponible, de manera que el represor del Gen operador Hemo pierde actividad y a su vez se re-inicia la síntesis de ALA-S y Hemo. Para explicar la relación 1:1 de Hemo a Globina en el monómero de la Hemoglobina, se propone que la Globina no se libera de los polisomas hasta que no se ha enrollado correctamente alrededor del Hemo.

VI.2.4.- Control por localización tisular y celular:

En todos los organismos es evidente que la síntesis de tetrapirroles debe estar regulada en última instancia en todos los tejidos a nivel de las etapas catalizadas por las enzimas involucradas en su camino biosintético.

Especialización tisular: La localización de la síntesis de Hemoglobina en los tejidos eritropoiéticos especializados en animales superiores, ha permitido explicar el problema que existiría de ocurrir una síntesis masiva de Hemoglobina simultáneamente con una síntesis mucho menor, necesaria para otras Hemoproteínas igualmente esenciales, como por ejemplo los citocromos. Los niveles de Hemoproteínas varían considerablemente en los distintos tejidos. Hay evidencias de que las células de cada tejido son capaces de sintetizar sus propias Hemoproteínas de novo, según sus necesidades.

Si bien no se dispone de la información completa sobre la biosíntesis de tetrapirroles en todos los tejidos, parece existir una precisa correlación entre los niveles de las enzimas de este camino biosintético y su correspondiente capacidad para formar sus Hemoproteínas (Tabla V). Por ejemplo, la actividad del ALA-D en conejo, es elevada en hígado, relativamente alta en médula ósea y riñón y muy baja en otros tejidos, como intestino delgado.

Tabla V : Actividad del ALA-D en distintos tejidos de conejo

Tejido	umoles de PBG / hr / gm tejido
Hígado	1,05
Médula ósea	0,24
Riñón	0,25
Cerebro	0,06
Músculo de corazón	0,04
Intestino delgado	0,04

Estos hechos sugieren que por lo menos en parte, la concentración de las enzimas en los distintos tejidos, determina o regula la cantidad de tetrapirrol formado por un tejido dado, que a su vez depende de las necesidades de Hemo que tiene.

VI.2.5.- Compartimentalización intracelular:

Estudiando la localización celular de las enzimas de la biosíntesis de porfirinas, llama la atención el hecho de que determinadas etapas tienen lugar dentro de la mitocondria, mientras que otras suceden en el citoplasma (Figura 50). De manera que los metabolitos así formados se ven forzados a difundir de un espacio a otro, lo cual, podría constituir de por sí un mecanismo regulatorio, especialmente si algunos de estos sustratos se encontraran en ciertas etapas, unidos a proteínas, con lo cual su difusión podría modificarse según el estado de la célula. Se han postulado asimismo la existencia de permeasas espe-

cíficas, que controlarían el pasaje de ALA y Coproporfirinógeno a través de la membrana mitocondrial; sin embargo aún no hay evidencias experimentales que avalen esta hipótesis, que no deja de ser atrayente.

Es igualmente importante tener en cuenta que la concentración estacionaria de ALA dentro de la mitocondria juega un papel relevante en la regulación de la biosíntesis de Hemo, pues ha de determinar la cantidad de ALA que se transporte al citoplasma y esté disponible para la síntesis de los tetrapirroles; pero a su vez, el estado estacionario de la concentración de ALA intramitocondrial estará gobernado por el nivel de Succinil CoA generado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Vemos así, que la maquinaria regulatoria de este camino, es relativamente compleja y está en realidad interconectada con otros caminos metabólicos, como ya vimos en el caso de la Globina y ahora con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos; por sólo ir mencionando un par de ellos.

VI.2.6.- Control por otros constituyentes del medio ambiente o celular:

VI.2.6.1. Oxígeno: La tensión de oxígeno y el estado de óxido-reducción de la célula, también influencian en forma diferencial distintas etapas en este camino metabólico y pueden jugar un papel regulatorio. Así por ejemplo, la transformación de Coproporfirinógeno en Protoporfirinógeno depende exclusivamente del oxígeno molecular, mientras que la inserción de hierro en Protoporfirina para formar el Hemo, está favorecida por condiciones relativamente anaeróbicas.

Comentamos también al comienzo, que la síntesis de tetrapirroles tanto en animales superiores como microorganismos está significativamente influenciada por la presión de oxígeno, aunque el mecanismo de acción en los primeros es aparentemente bastante complejo. En bacterias fotosintéticas la acción del oxígeno está algo más aclarado, aunque no es tampoco simple, pero actuaría en última instancia aumentando la síntesis de un compuesto que inhibiría al ALA-S.

VI.2.6.2. Iluminación: En bacterias fotosintéticas, las condiciones de iluminación desempeñan asimismo un rol importante en la regulación de la biosíntesis de clorofila, como en el caso del oxígeno, una elevada intensidad luminosa reprime la síntesis de ALA-S, de manera que se ha sugerido que en estos organismos, los efectos de la luz y el oxígeno podrían responder a un mecanismo de control común; vinculado con la concentración de cierto carrier en la cadena de transporte de electrones, y eventualmente con los niveles de ATP.

VI.2.6.3. ATP: En cuanto al rol del ATP en la regulación de la biosíntesis del Hemo, las primeras indicaciones experimentales en favor de la importancia de la concentración intracelular del ATP en el control de la síntesis de las porfirinas, provienen de los trabajos de Gajdos y Gajdos-Torok (1969), quienes demostraron que el agregado de ATP al medio de crecimiento de Rh. spheroides, inhibía significativamente la síntesis de porfirinas. Paralelamente encontraron que en animales de laboratorio, con porfiria inducida por ciertos agentes porfirinogénicos, los niveles de ATP estaban disminuídos, pero si se administraba ATP, ADP o AMP, se corre

gía la Porfiria. Postularon luego, que el efecto del ATP se localizaba a nivel del ALA-S mitocondrial, a través de la formación, inducida por el ATP, de un inhibidor de naturaleza proteica. Más recientemente (Ohashi y Sinohara, 1978) se ha reportado que el ATP estimula significativamente la actividad del ALA-S citoplasmática en hígado de rata y aunque aún no se conoce cuál sería el mecanismo involucrado, se ha postulado que el ATP se uniría a un sitio alostérico de la enzima y podría provocar cambios conformacionales positivos en los sitios de unión de los sustratos glicocola y succinil CoA, que llevarían a una estimulación de la actividad del ALA-S. Es decir, se trataría de una acción del ATP diferente a la propuesta por Gajdos Gajdos-Torok, aunque compatible, pues análogamente a lo discutido en cuanto a los efectos del Hemo, el ATP podría desempeñar un papel regulatorio dual, actuando directamente o indirectamente sobre la actividad de la enzima regulatoria ALA-S.

VI.2.7.- Control por inter-conección con otros caminos metabólicos:

Ya hemos mencionado que los mecanismos de regulación del Hemo se deben encontrar muy bien coordinados, por ejemplo, con los de formación de las proteínas específicas que constituyen las distintas Hemoproteínas. Otro hecho importante en este aspecto, era el estado estacionario de la concentración de ALA intramitocindrial, que a su vez estaba también estrechamente vinculado con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que regulaba el nivel de Succinil CoA. Es estado de óxido-reducción y la cantidad de ATP celular, eran otros factores que jugaban asimismo un papel significativo, enfatizando todo ello el hecho de que el sistema de regulación de esta cadena metabólica es bastante complejo e indudablemente está inter-relacionado con el de varios otros caminos.

Es importante agregar todavía, un mecanismo adicional de control de la biosíntesis de tetrapirroles en Rh. spheroides, propuesto recientemente por Wider de Xifra y colaboradores (Figura 51) (Wider de Xifra, Sandy, Davies y Neuberger, 1976), según el cual, la actividad de la enzima reguladora ALA-S, estaría controlada por la presencia de un compuesto de bajo peso molecular, una Cistina trisulfuro que es capaz de convertir una forma inactiva del ALA-S en una forma de alta actividad, según las necesidades de la célula. Pero lo interesante, es que la formación de este activador, está catalizada por una enzima, la Cistationasa, que ha sido extraída e identificada mientras que de las mismas células se ha extraído otra enzima, la Rodenasa, que cataliza la degradación de la Cistina trisulfuro. Se postula entonces, que el contenido intracelular del activador del ALA-S, Cistina trisulfuro, está controlado por las actividades relativas de la Cistationasa y la Rodenasa, que son dos enzimas involucradas en el metabolismo de los compuestos sulfurados.

Vemos así, otro ejemplo más de la extraordinaria eficiencia y complejidad de los finos sistemas de control, de los cuales depende y al mismo tiempo aseguran, el normal funcionamiento de la intrincada maquinaria celular.

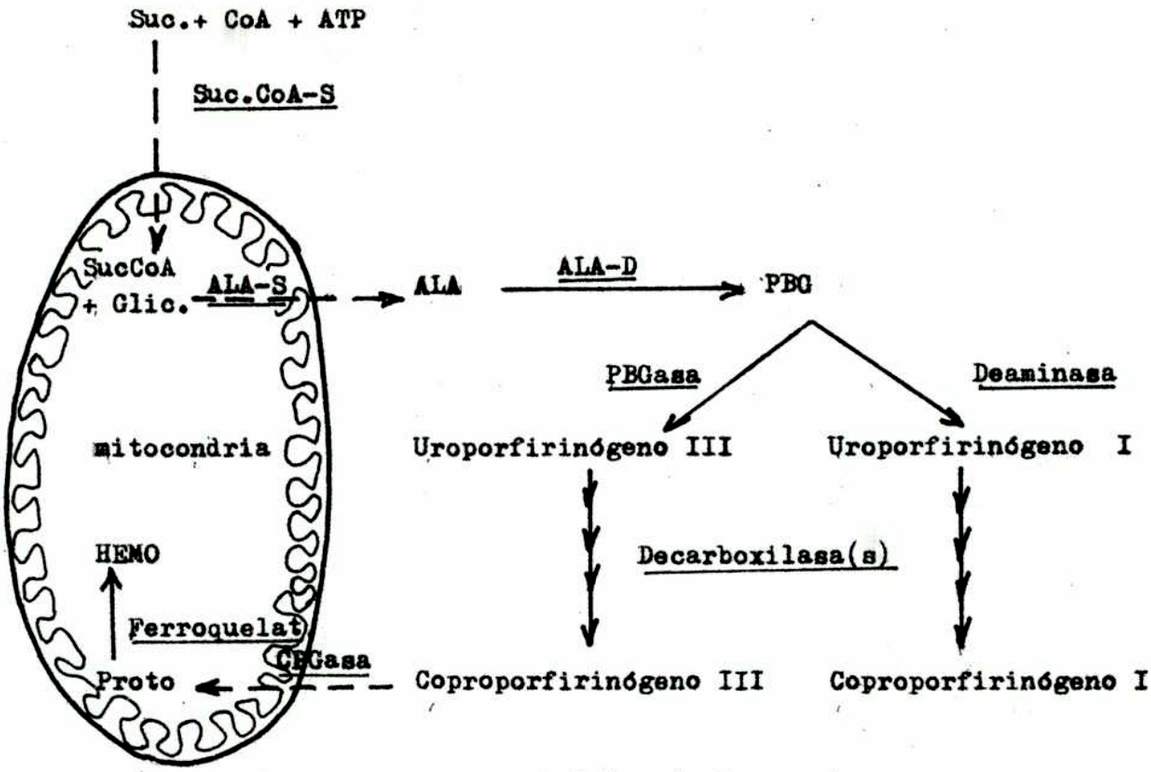


Figura 50: Localización intracelular de las enzimas involucradas en el camino biosintético del Hemo.

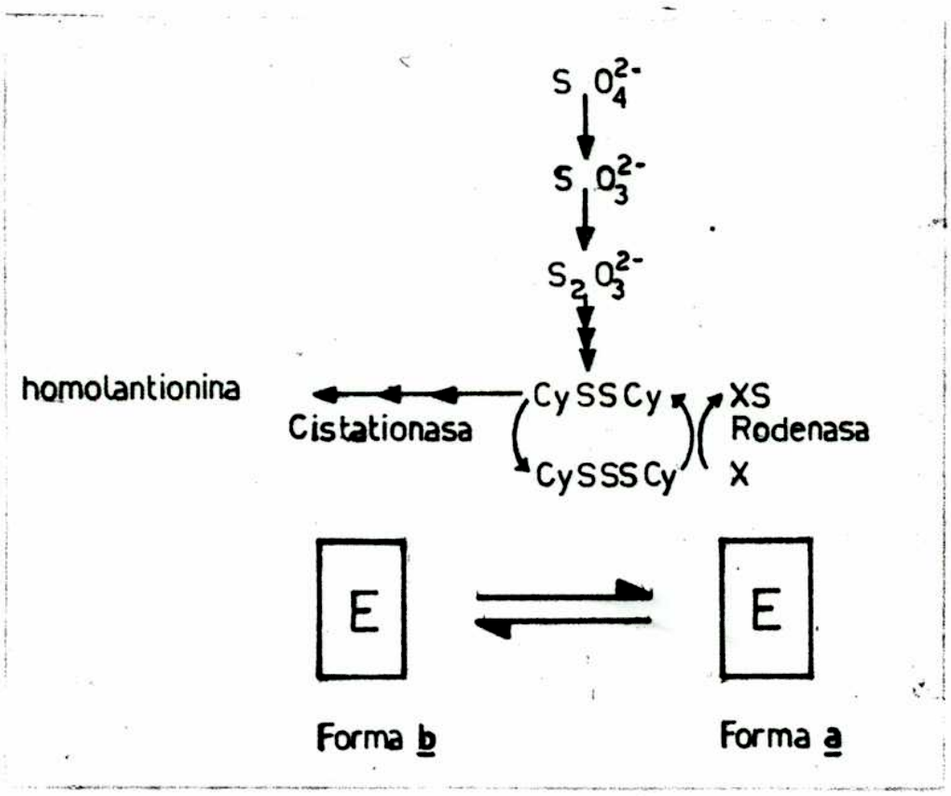


Figura 51: Esquema postulado para el control de la actividad del ALA-Sintetasa en Rh. spheroides.

B. EUGLENA

"El género Euglena está compuesto por muchas especies, las cuales se han adaptado y ocupado una amplia variedad de nichos ecológicos. Un estudio comparativo de la ultraestructura de aquellas que son representativas, sería relevante en lo que a adaptación morfológica de las células, a distintas condiciones ambientales, se refiere.

Ninguna de ellas se encuentra en todos los nichos ecológicos, sin embargo, se deberían examinar la mayoría de las especies; el esfuerzo vale la pena, especialmente si se puede combinar con los estudios bioquímicos y fisiológicos adecuados"

Buetow, D.E. (1968). In "The Biology of Euglena". Vol. 1, p. 180.

"Podría anticiparse que si, finalmente, se descubre la meiosis en Euglena, ésta sería tan peculiar en su forma y tan específica para los euglenoides, como la mitosis. Si existiese sexualidad en el género y si, eventualmente, se la pudiese inducir y controlar experimentalmente, entonces Euglena agregaría el rol de un microorganismo genético a sus ya versátiles condiciones como una valiosa herramienta en la biología celular"

Leedale, G.F. (1968). In "The Biology of Euglena". Vol. 1, p. 239.

I.- SU IMPORTANTE ROL EN LA INVESTIGACION

Una revisión de la literatura existente sobre Euglena inmediatamente nos revela la amplia variedad de experimentación biológica realizada empleando este microorganismo.

Esto es el resultado de la ubicación taxonómica, poco común y bastante discutida por cierto, ocupada por los miembros de este género.

Las características, tanto del reino vegetal como del animal, que poseen, los convierte en un interesantísimo objeto de investigación, al mismo tiempo que todavía constituyen un problema texonómico universal para los biólogos.

Aún hoy los botánicos y zoólogos se disputan su pertenencia, considerando a Euglena como un alga o un protozoo respectivamente; sin embargo, dada sus características, lo correcto es incluirla en el reino PROTISTA, creado por Haeckel en 1866.

El género posee un gran número de formas taxonómicas estables y habita una amplia variedad de nichos ecológicos incluyendo: aguas frescas ricas en materiales orgánicos (E. gracilis); aguas contaminadas y salobres, ácidas y alcalinas (hasta pH=8, en el laboratorio pueden vivir pero no dividirse a mayores pHs), aeróbicas y anaeróbicas y también aguas tropicales; se pueden encontrar especies del género aún en el barro ó lodo ubicado en las orillas de los ríos, estuarios y pantanos; sobre la corteza de los árboles; en suelos húmedos y secos en forma de quistes; en hoyos ó cavidades de árboles y también sobre la nieve. Wenrich (1924) reportó el hallazgo de Euglenamorpha hegneri en el intestino de renacuajos, y años más tarde, en 1965 Michejlow describió la presencia de formas parásitas en el intestino de copepoda. Esta amplia variedad de habitats nos lleva a pensar que el género Euglena debe comprender seguramente, un elevado número de especies. Efectivamente, Godjdies (1953) describió e ilustró 155 especies de Euglena, Huber-Pestalozzi (1955) hizo lo mismo con 101 especies y Pringsheim (1956) reportó la presencia de 200 especies. Actualmente el número total se aproxima a 250, pudiéndose encontrar prácticamente toda la gama de transformaciones energéticas biológicas (excepto posiblemente, la anaeróbica), entre las diferentes especies del género.

Así, estos flagelados se caracterizan por su habilidad para usar la fotosíntesis y la asimilación oxidativa heterotrófica como fuentes intercambiables y esencialmente equivalentes de carbono y energía.

El grado de intercambiabilidad varía de especie a especie. Euglena gracilis var. bacillaris cultivada autotróficamente en la luz ó heterotróficamente, empleando cualquiera de las diversas fuentes de carbono conocidas, crece igualmente bien; mientras que la cepa vischer de Euglena gracilis crece más rápidamente en la luz que en cualquiera de los diversos compuestos orgánicos probados (Cramer y Myers, 1952).

En un extremo, se encuentran los foto-autotrofos obligados, tales como E. pseiformis (Lwoff, 1951), y en el otro los heterótrofos obligados como Astasia y las cepas blanqueadas de Euglena.

El equivalente funcional heterotrófico de la fotosíntesis, es el metabolismo de los compuestos orgánicos como principal fuente de carbono y energía. En estos microorganismos es un proceso de "asimilación oxidativa" (Barker, 1936; Griffiths, 1965) en el cual un solo sustrato provee ambos componentes, energía y carbono para el crecimiento.

Aparentemente, los procesos de oxidación y asimilación se encuentran indivisiblemente relacionados.

Es importante hacer notar también que Euglena es el único organismo disponible para el estudio de la fijación heterotrófica de CO_2, dada su gran capacidad para llevarla a cabo, definiendo la misma como el "crecimiento en presencia de uno ó más metabolitos esenciales, obteniéndose toda la energía necesaria a partir de reacciones químicas en la oscuridad, por ejemplo, la oxidación de sustratos orgánicos exógenos." Así, el crecimiento de células blanqueadas de Euglena puede ser descripto como químio-órgano-heterotrófico (Fogg, 1953). Euglena podría ser, por lo tanto, una valiosa herramienta para aquellas investigaciones sobre los mecanismos de control que involucren el CO_2.

El elevado número de trabajos sobre fotosíntesis en los cuales se emplea Euglena se debe, fundamentalmente, a los cambios composicionales asociados con la transición de un metabolismo de tipo animal en la oscuridad a un metabolismo fotosintético, como el que ocurre en las plantas, en la luz.

Estos atributos, más la formación de cepas incoloras y la ausencia de una sexualidad comprobada ó verificada en el género, constituyen problemas especiales y hasta enigmáticos para los taxonomistas y evolucionistas.

Euglena gracilis provee un sistema experimental de gran utilidad para el estudio de la función y especificidad de los ácidos nucleicos, debido a que las células se pueden hacer crecer fácilmente, y los cultivos pueden someterse a una gran variedad de alteraciones fisiológicas.

Se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de los cambios que se producen en el contenido de ácidos nucleicos bajo diferentes condiciones de crecimiento, y la mayoría de sus componentes ya han sido caracterizados.

Por otro lado, el sistema cloroplástico de E. gracilis es de particular interés e importancia para el estudio de la especificidad de los ácidos nucleicos. Los plástidos comprenden aproximadamente la mitad del contenido proteico total de las células verdes; tienen DNA, RNA y un sistema propio de síntesis proteica.

Además, el desarrollo de los cloroplastos en E. gracilis se puede controlar fácilmente, y su replicación puede ser bloqueada por una gran variedad de agentes, que no llegan a afectar la multiplicación celular; por lo tanto, brinda al investigador la posibilidad de estudiar componentes específicos relacionados

con la síntesis y replicación de una estructura celular definida. En el campo de los lípidos, Euglena es un sustituyente muy promisorio de las bacterias, como herramienta en la investigación de la biosíntesis y función de estos compuestos, puesto que la utilidad de las bacterias se ve limitada por su incapacidad para sintetizar esteroles y ácidos grasos poliinsaturados, componentes de las membranas de las células eucarióticas. Por el contrario, como Euglena crece bien, tanto en medios simples como definidos, tiene altamente desarrollados los caminos de biosíntesis de fosfolípidos, siendo capaz además, de adaptar su maquinaria bioquímica y fisiológica a ambos modos de existencia; animal y vegetal.

Prácticamente, todos los conocimientos acerca del metabolismo lipídico en euglenoides, se debe a los resultados obtenidos de estudios realizados en Astasia longa, E. gracilis var. bacillaris y E. gracilis Z.

En el área de investigación de los carbohidratos Euglena es también ampliamente utilizada debido a la versatilidad de los sistemas sintetizantes de estos compuestos que posee, como lo demuestra la variedad de azúcares encontrados en la mucina y glicolípidos, y la presencia de paramilón, el cual constituye una forma bastante inusual de reserva de carbohidratos.

E. gracilis, con su limitada permeabilidad, es un organismo apropiado para discernir ó estudiar el modo de acción de muchos, probablemente la mayoría, de los inhibidores metabólicos; además de aquellos que afectan específicamente la fotosíntesis.

Otra área de la investigación biológica para la cual Euglena representa una herramienta sumamente útil, es la genética. Si bien su empleo se ve limitado para los estudios genéticos clásicos, debido a que no se han descubierto, hasta el momento, estados sexuales en el ciclo de vida de Euglena; ciertas propiedades específicas la convierten en un organismo sumamente atractivo para estudios sobre el desarrollo y herencia de los plástidos.

De estas propiedades, las más siginificativas son: (1) La capacidad de Euglena para crecer heterotróficamente en la oscuridad sin cloroplastos; estas células etioladas contienen pequeños "proplástidos" incoloros que se transforman en cloroplastos completamente maduros bien desarrollados cuando las células se transfieren a la luz.

(2) La sensibilidad de los plástidos a la acción de varios mutágenos, agentes que dotan a la célula de una incapacidad permanente para convertir los proplástidos en cloroplastos; a estas células se las llama "bleached" o "blanqueadas".

Además, las células de Euglena son objeto de un uso extensivo en estudios de crecimiento y desarrollo de los cloroplastos, ya que, a diferencia de la mayoría de los organismos fotosintéticos, muchas de las cepas de Euglena no son afectadas por la pérdida de los cloroplastos, siempre y cuando se les proporcione otra fuente de nutrición.

Estos estudios, encuentran impulso adicional por su facilidad para crecer tanto en medios líquidos como sólidos.

Así, la complejidad que presentan desde éstos y otros puntos de vista, consecuencia evidente de su exclusiva ubicación taxonómica, llevó a los investigadores a no seguir refiriéndose a Euglena como un "organismo simple".

El desarrollo de una nueva área de investigación depende siempre del descubrimiento, ó de la búsqueda del "modelo experimental correcto"; podemos así vislumbrar que el género Euglena nos ofrece una variedad muy amplia de tipos celulares, constituyéndose por ende en un organismo muy atrayente para su estudio, en la mayoría de los campos comprendidos dentro del área biológica.

El considerable conocimiento sobre la fisiología nutricional de Euglena; la disponibilidad de formas autotróficas y heterotróficas, temporarias ó permanentes; y la posibilidad de controlar el crecimiento y división, sincrónicamente si fuera necesario, le ofrece al bioquímico un sistema sumamente flexible no tan fácilmente disponible con otros tejidos.

Euglena oracilis: es la especie más estudiada dentro del género Euglena; pudiéndose encontrar diferentes cepas dentro de ella.

La TABLA VI muestra el tiempo de generación y el peso seco de las tres cepas más comunmente estudiadas.

TABLA VI

Características del crecimiento de tres especies de E. gracilis (a)

Característica	E. gracilis Z	E. gracilis var.bacillaris	E.gracilis var.bac. SM-L 1 (b)
Tiempo de generación (hs)	14	24	21
Peso seco (p.gr./célula)	570	640	995

(a) Crecida en un medio definido, en oscuridad, a 27°C, con acetato de sodio 0.061 M (Kemper, 1965).

(b) Blanqueadas con streptomicina.

Por ejemplo, E. gracilis Z crece bien en un medio definido, conteniendo grandes cantidades de metales (Kemper Miller, 1965); mientras que la cepa SM-L1 se lisa y muere en el mismo medio.

Debe enfatizarse que entre las distintas cepas de E. gracilis podemos encontrar toda una amplia gama, desde fotótrofas obligadas hasta heterotróficas.

El hecho de que Euglena gracilis sea objeto de estudios en laboratorios de taxonomistas, botánicos, zoólogos, bioquímicos, biofísicos o fisiólogos, es una buena muestra del diversificado interés y empleo que existe sobre la misma.

Por último, podemos decir, que el estudio de estos organismos, acompañado por experimentos bien elegidos ó planeados, sobre especies más especializadas, todos llevados a cabo bajo condiciones de laboratorio bien bontroladas y con la atención apropiada a las diferencias entre las distintas cepas, puede ayudar a una mejor comprensión de los mecanismos celulares de adaptación y sobrevivencia.

III.- MORFOLOGIA

La morfología de los miembros del género Euglena ha sido objeto de interés desde la primera descripción de este organismo, realizada por Ehremberg en 1830 (Figura 52).

III.1.- TAMAÑO

El tamaño de una célula de Euglena varía desde 12 x 15 u (E. minuta) hasta 530 x 40 u (E. Oxyuris); no obstante, éste no es necesariamente una constante, pudiendo encontrarse variaciones en tamaño, aún entre los miembros de una misma especie. Además, el tamaño de una célula de Euglena depende de una amplia variedad de condiciones; por ejemplo, el tamaño de las células de E. gracilis cambia con el ciclo de crecimiento y cuando son transferidas a medio fresco su volumen aumenta significativamente. Por lo tanto, el tamaño de las células de Euglena no es una propiedad útil para la diferenciación entre especies.

III.2.- FORMA

La forma varía desde casi esféricas (E. inflata) hasta casi cilíndricas (E. acus y E. deses); sin embargo, la mayoría de las especies son fusiformes o "spindle-shaped".

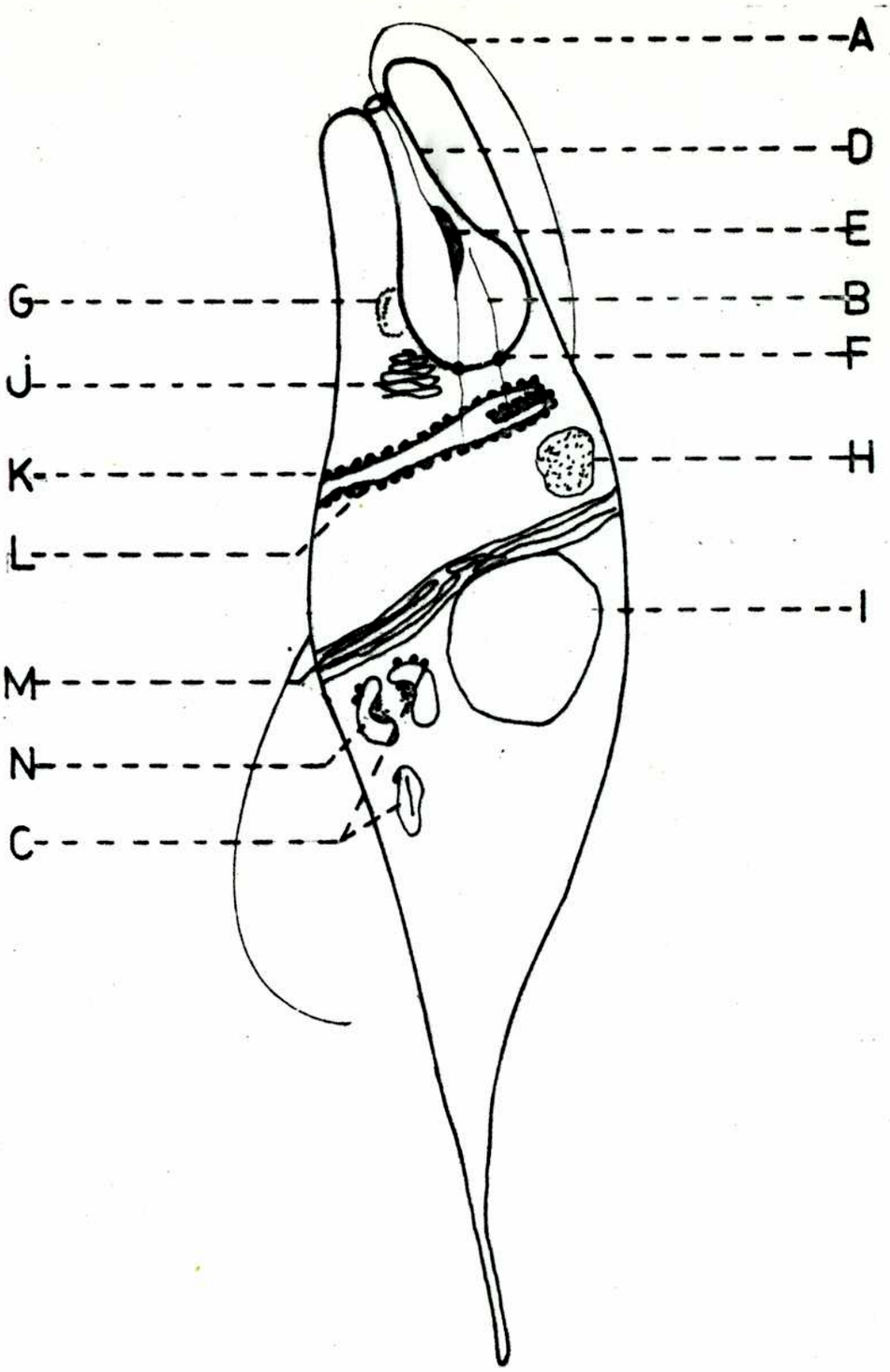
III.3.- COLOR

Casi todas las especies son verdes debido a la presencia de clorofila, la cual no se encuentra dispersa en gránulos sino agrupada en los cloroplastos, existiendo una gran diversidad en cuanto al número y forma de los mismos según la especie. Hay algunas que son incoloras, resultado de un blanqueamiento (bleaching) por agentes tales como la estreptomicina y temperaturas elevadas.

Existen también, cerca de una docena de especies coloreadas por gránulos rojos (de 0,5u ó menos de diámetro), conocidas genéricamente como hematocromos (Jahn, 1946; Godjics, 1953). Cuando estos gránulos están concentrados en el centro de la célula, ésta conserva su color verde debido a la distribución perisférica de los cloroplastos. En cambio, cuando los gránulos están dispersos, la célula toma color rojo. El mismo pigmento u otro similar se encuentra ocasionalmente en pequeñas cantidades, en especies que no aparecen rojas tales como E.gracilis, E. pisciformes, E. tanabaena, etc., (Hall, 1933; Jahn, 1946). La presencia de clorofilas a y b y la ausencia de clorofila c en Euglena puede indicar cierta afinidad con las algas marrones; aunque se ha reportado la presencia de una xantina en E. gracilis (Krinsky, 1964).

III.4.- FLAGELOS

Se caracterizan por poseer dos flagelos; ambos emergen de sus respectivos cuerpos basales (kinetosomas o befaroplastos), los cuales se encuentran loca-



A - flagelo locomotriz
B - flagelo interno (generalmente adherido al fotoreceptor)
C - paramilón envainado en los pirenoides o libre
D - canal
E - fotoreceptor
F - reservorio
G - vacuola contráctil
H - mitocendria
I - núcleo
J - aparato de Golgi
K - retículo endoplásmico
L - ribosomas
M - cloroplastos
N - pirenoides

Figura 52: Representación esquemática de la célula de Euglena.

lizados por debajo de la membrana del reservorio. Durante la división celular cada kinetosoma se divide en dos, formando luego el flagelo correspondiente. Uno de ellos, el más largo, se extiende por la apertura anterior del canal hacia el exterior y como posee movimiento flagelar es empleado para la locomoción constituyendo además, una estructura fotosensible a nivel del "eyespot".

El otro, sin movimiento flagelar, se encuentra contenido dentro del reservorio; es más delgado y corto que el locomotor y está adherido o unido a éste aproximadamente a la altura del "eyespot", de tal forma que el conjunto de ambos puede confundirse con una estructura flagelar bifurcada. Algunos autores niegan la unión de ambos flagelos en ciertas especies de Euglena.

Cabe agregar que el flagelo locomotor puede presentar una longitud variable, aún entre los miembros de una misma población de Euglena; se puede perder fácilmente en situaciones de stress o irritación, pero puede regenerarse bajo las condiciones apropiadas. Sin embargo, algunas especies presentan flagelos más resistentes, por ejemplo en E. gracilis Z el movimiento flagelar continúa aún cuando las células son expuestas a elevadas presiones hidrostáticas (Byrne Marsland, 1965). Contrariamente, el movimiento euglenoide o"metaboly" cesa a bajas presiones.

II.5.- COMPLEJO PELICULAR

No poseen pared celular, encontrándose la zona más externa del citoplasma diferenciada (o engrosada) constituyendo lo que se denomina Complejo pelicular, película o periplasto.

Esta película puede ser lo suficientemente flexible como para que la forma celular varíe durante el movimiento euglenoide, como ocurre en E. gracilis; muy poco flexible como para minimizar dicho movimiento (E. tripteris) o rígida, de tal forma que la célula adquiere una forma fija e invariable (E. phocus).

Además, el periplasma (zona más interna) no es liso, sino que presenta estriaciones longitudinales espiraladas. Micrografías electrónicas de células de E. gracilis han revelado la presencia de crestas (ridges) y ranuras o canaletas peliculares, observándose que toda la célula incluyendo el periplasma está cubierta por una membrana "tripartita" llamada plasmalemma. O sea, el plasmalemma es una tricapa de unidades de membrana, es contínua y cubre los lomos, cavernas, flagelos, reservorio, etc., y en algunas células está cubierta por un material granular.

En efecto, existen especies que, bajo determinadas condiciones, pueden formar protuberancias a lo largo de las estriaciones, las cuales pueden estar compuestas según algunos autores, por Fe o compuestos de Mn; según otros son geles inorgánicos o están formados por sustancias exudadas a través de los poros de la película.

Resumiendo, este complejo pelicular estaría constituído, en E.gracilis Z por una película en la cual se pueden distinguir:

i) una densa capa externa o plasmalemma de aproximadamente 90 Å;
ii) un espacio de 80 Å de ancho (fibrillas o microtúbulos);
iii) una densa capa interna de 60-80 Å (retículo endoplasmático subpelicular que está en conexión con el citoplasma).

Según Blum et al (1965), E. gracilis posee aproximadamente 40 complejos peliculares (célula adulta); como este número, según Blum y Sommer (1965) varía con la especie, sugirieron que podía considerárselo como característica taxonómica, en oposición a los hallazgos de Kirk Jumper (1964) quienes reportaron un número variable de complejos peliculares también para E. gracilis.

Cuando cultivos de E. gracilis son privados de una fuente de carbono, las células entran en un estado estacionario prolongado, postmitótico y todo el cultivo puede permanecer viable por aproximadamente 15 días. Durante este período las células se achican y llevan a cabo una serie de cambios degradativos, a pesar de lo cual la película retiene sus lomos característicos (Brandes et al, 1964; Malkoff y Buetow, 1964).

Células de E. gracilis crecidas en un medio normal en cuanto a contenido de ortofosfato, tienen una actividad constitutiva de fosfatasa ácida, principalmente en los cuerpos de Golgi, alrededor de los gránulos de paramilón y del reservorio y en algunas mitocondrias. Si las células son privadas de ortofosfato, se induce una fosfatasa ácida; así en estas células (que ya tienen una actividad constitutiva) la actividad inducida se encuentra también presente en la película, localizada en las cavernas o hendiduras de cada complejo pelicular cerca del retículo endoplasmático subpelicular. Esta localización, cerca de la superficie celular, sugiere que su función es la de una hidrolasa no específica de fosfatos orgánicos que actuaría durante la privación externa de ortofosfato.

II.6.- STIGMA Y CUERPO PARAFLAGELAR

II.6.1. Stigma:

Es stigma o "eyespot" está presente en todas las especies normalmente verdes de Euglena. Está localizado sobre la superficie del reservorio, próximo a la comunicación de éste con el canal o "gullet", enfrentando al cuerpo paraflagelar o fotoreceptor constituído por un ensanchamiento del flagelo.

En E. gracilis los stigmas se asemejan a corpúsculos o glóbulos homogéneos y densos, de diámetro variable (150-660 mu), con densos "rims" de 100 Å de ancho (Gibbs, 1960). En trabajos anteriores, Wolken y Palade (1953) y Wolken (1958), habían reportado que el stigma tenía aproximadamente 2 u de diámetro y 3 u de longitud y consistía de 30 a 50 gránulos los cuales variaban en tamaño desde 100 a 300 mu. Ueda (1958) reportó que el "eyespot" estaba formado por varios gránulos esféricos de 200 mu de diámetro y que cada gránulo estaba rodeado por

una membrana. Estos gránulos parecían estar libres en el citoplasma, formando una estructura flojamente empaquetada, en vez de un conjunto hexagonal fuertemente empaquetado y embebido en una matriz como había sido descripto por Wolken y Palade (1953).

Wolken (1956) estimó que el eyespot contenía 5×10^5 a 1×10^6 moléculas de pigmento. Los gránulos del "eyespot" de E. gracilis Z han sido aislados por Batna Tollin (1964) y bajo el microscopio electrónico, los gránulos seccionados aparecen como esferas huecas de diferentes tamaños. Sus pigmentos, aislados, han sido identificados en base a sus compartimientos cromatográficos, espectrofotométricos y sus coeficientes de partición.

La luteína (o probablemente anteraxantina) y criptoxantina comprenden el 83% de los pigmentos; el resto lo constituyen β caroteno y un compuesto no identificado. La astoxanthin, un carotenoide animal, presente en otras especies de Euglena, no ha sido encontrado en células enteras de E. gracilis, ni en "eyespot" aislados de E. gracilis Z.

A pesar que el calor y la estreptomicina (como veremos más adelante), especialmente bajo condiciones que permiten la división celular, blanquean la Euglena, o sea afectan el desarrollo de los cloroplastos; los resultados obtenidos con el stigma son variables.

En algunos clones de E. gracilis, permanentemente blanqueados por efecto del calor, el "eyespot" persiste, aún cuando las células son iluminadas. Es conveniente aclarar aquí que el espectro de acción para la preservación del "eyespot" corresponde a la luz absorbida por los carotenoides (Hutner y Provasoli, 1955).

Estos mismos clones, aún después de 6 meses de blanqueamiento y de varios subcultivos, sólo llegaron a perder el stigma cuando las células se colocaron en la oscuridad (Pringsheim y Pringsheim, 1952).

Así en la mayoría de las cepas de Euglena blanqueadas por el calor, el stigma se preserva en la luz y se pierde en oscuridad. Ocasionalmente, en algunas de estas cepas, el stigma sólo se empequeñece en ausencia de luz.

Los cloroplastos pueden ser destruídos y el stigma preservado, pero lo opuesto nunca ocurre; no se han encontrado células verdes sin "eyespot" (Pringsheim, 1956).

La estreptomicina tiene un efecto similar sobre el "eyespot" y cloroplastos (Pringsheim y Pringsheim, 1952); tanto uno como otro, una vez perdidos no se regeneran. No obstante, la nutrición heterotrófica y el vigor reproductivo no se encuentran afectados en cepas tratadas con estreptomicina o sometidas a temperaturas elevadas.

II.6.1. Cuerpo paraflagelar

El cuerpo paraflagelar es ovalado o ligeramente plano-curvo y se encuentra ubicado sobre el flagelo, dentro del reservorio, a nivel del "eyespot".

En E. gracilis se replica junto con el stigma en metafase. Cuando diferentes cepas de Euglena gracilis se exponen a temperaturas muy altas o a la acción de la estreptomicina, el cuerpo paraflagelar desaparece junto con el "eyespot" y los cloroplastos (Pringsheim, 1956).

Sin embargo, Vavra (1956) encontró una cepa de E. gracilis en la cual este cuerpo se conserva, cuando el tratamiento con estreptomicina destruye el "eyespot" y los cloroplastos.

A pesar que todos los estudios realizados permitieron determinar claramente que ambas estructuras, "eyespot" y cuerpo paraflagelar, son estructuras e independientes y separadas, la evidencia concluyente de que el cuerpo paraflagelar es el verdadero fotoreceptor provino de Tchakhotine (1936), quien irradió con luz U.V. zonas localizadas de células de E. gracilis logrando destruir el stigma. Dichas células se movían desde la luz hacia la sombra, mientras que aquellas que poseían el stigma intacto no exhibían ese comportamiento.

Por lo tanto, parecería que el stigma funciona como una "pantalla o escudo", absorbiendo y seleccionando los rayos luminosos que llegan a la célula, protegiendo de esta forma al cuerpo paraflagelar que sería el verdadero fotoreceptor. A medida que las células de Euglena "rotan" el stigma actuaría protegiendo continuamente al cuerpo paraflagelar. La estructura fina del fotoreceptor o cuerpo paraflagelar no ha sido aún resuelta y por lo tanto, no es posible compararlo estructuralmente con otros fotoreceptores conocidos.

II.7.- CANAL Y RESERVORIO

Los euglenoides flagelados poseen una invaginación anterior de la célula de la cual emerge el flagelo locomotor. Esta invaginación consiste de dos partes: el canal (o "gullet" o "cytopharynx") y un reservorio interno. La apertura anterior del canal al exterior es llamado "citostoma". Ni el canal ni el reservorio están relacionados con la ingestión de partículas sólidas, puesto que no existe ninguna especie de Euglena que sea holozoica.

El reservorio está permanentemente conectado al exterior a través del canal. En todas las especies de Euglena el canal es subapical y está localizado sobre el lado de la célula opuesto al "eyespot"; sólo el plasmalemma cubre la región posterior del canal y el reservorio. El reservorio de E. gracilis es una cámara colectora dentro de la cual las vacuolas contráctiles vacían sus contenidos (Pringsheim, 1956); éstas a su vez los toman (o se forman) de las vacuolas secundarias o accesorias, que extraen su fluido del citoplasma.

La disposición y ubicación de este sistema excretor es característico de las especies y forma de las células; así en las especies alargadas el reservorio y la vacuola contráctil se ubican sobre el eje longitudinal de la célula; en aquellas más esféricas están situados de un lado a otro de la célula.

En E. gracilis la vacuola contráctil está limitada por una membrana de 80-100 Å de espesor y está ubicada cerca del reservorio. Cuando llega el momento de descargar su contenido en él, las membranas entre ambas desaparecen o se fusionan y el fluido de la vacuola se vacía dentro del reservorio. Este retorna inmediatamente a su forma y posteriormente se origina una nueva vacuola contráctil a partir de las vacuolas secundarias. Inmediatamente después que la vacuola contráctil se descarga, la región citoplasmática, donde se ha de formar una nueva vacuola, contiene vacuolas secundarias colapsadas y numerosas vesículas esféricas de 100 Å de diámetro. Estas vesículas se encuentran solamente en esta región del citoplasma y se piensa que son osmo-regulatorias (Leedale et al, 1965) y pueden fusionarse con las vacuolas secundarias, con la vacuola principal o con el reservorio.

II. 8.- MITOCONDRIAS

Con la ayuda de la microscoía alectrónica se ha demostrado que las mitocondrias pueden variar en tamaño, forma y número.

En E. gracilis la mitocondria está limitada por dos membranas de 60 Å entre ellas (Gibbs, 1960); la membrana interna está invaginada formando crestas que se ubican perpendicularmente al eje longitudinal de la mitocondria.

Reger y Beanes (1954) reportaron que en E. gracilis las mitocondrias pueden, ocasionalmente, contener gránulos densos de significado desconocido, en tanto que Brandes et al (1964) encontraron que algunas mitocondrias muestran actividad de fosfatasa ácida, apareciendo los sitios de reacción como grupos o racimos separados, ya sea en las crestas, en la matriz o en ambas.

Pringsheim (1956) demostró que las mitocondrias de E. gracilis se ven, bajo la luz del microscopio electrónico, como bandas relativamente largas, que se fusionan y ramifican para formar una red o bien como formas cortas redondeadas.

Estos dos tipos de mitocondrias han sido encontradas aún en células pertenecientes a un mismo clon, pero generalmente bajo diferentes condiciones de crecimiento.

O sea que, en general, las mitocondrias de las especies de Euglena muestran la arquitectura básica común a todas las mitocondrias, pero parecerían ser más elásticas, mostrando cambios en tamaño, forma y número, de acuerdo con las condiciones externas.

Las mitocondrias de los euglenoides presentan dos características básicas: una membrana externa irregular y una constricción basal de cada cresta.

Pringsheim y Hovasse (1948) demostraron que las mitocondrias de células etioladas de Euglena están más desarrolladas que las de las correspondientes células verdes.

Existe además, un considerable incremento en el número de las mitocondrias en condiciones en las cuales el contenido en cloroplastos se encuentra disminuído; por ejemplo, en E. gracilis adaptada para crecer en la oscuridad; en E. spirogira incolora por acción del calor y en una variedad de mutantes de las diferentes especies de Euglena. No obstante, la organi-ación de las mitocondrias de E. gracilis adaptada a crecer en presencia o ausencia de luz, es la misma (Wolken y Palade, 1953).

Por otro lado, cultivos en fase estacionaria (9-12 días) de E.gracilis Z, muestran células cuyas mitocondrias tienen crestas estructuralmente alteradas (Siegesmund et al, 1962).

Cuando células de E. gracilis blanqueadas por acción de estreptomicina, son privadas de una fuente de carbono (por ejemplo acetato), varias de las mitocondrias se encapsulan en cavidades rodeadas por una membrana, comparables a las vacuolas autofágicas encontradas en células de organismos superiores. Estas mitocondrias encapsuladas son digeridas, mientras que la mayoría de las remanentes aparecen normales, aunque en su mayoría distribuídas linealmente a lo largo de la periferia de la célula.

Si a células de Euglena se las priva de una fuente de carbono, a los 7 días suelen aparecer, ocasionalmente, mitocondrias extremadamente largas ubicadas también rodeando el contorno celular. Si a los 8 días se repone la fuente de carbono, la capacidad oxidativa aumenta, llegando en 20-25 horas a los valores iniciales (Blum y Buetow, 1963); durante este período de normalización se encuentran varias mitocondrias hipertrofiadas, las cuales retornan a su forma y tamaño luego de 49 horas de haberse repuesto la fuente de carbono necesaria.

II.9.- APARATO DE GOLGI

Estos microorganismos presentan un aparato de Golgi (o dictiosoma) típico; los cuerpos de Golgi están bien desarrollados y distribuídos a través de toda la célula de Euglena (Beams y Anderson, 1961; Pitelka, 1963; Voeller, 1964; Round, 1965).

En E. gracilis los cuerpos de Golgi son numerosos y consisten de 8 a 20 cisternas planas o lamelas las cuales muestran dilataciones saculares en uno o ambos extremos. También se suelen encontrar vesículas y vacuolas concentradas alrededor del Golgi cuyo tamaño oscila entre 25 a 80mu.

Se ha observado, mediante técnicas de citoquímica electrónicos, una actividad constitutiva de fosfatasa ácida en el Golgi de E. gracilis (Brandest et al, 1964; Sommer y Blum, 1965 b), localizada ocasionalmente en el retículo endo-

plasmático pelicular y alrededor del reservorio, como ya se ha descripto anteriormente. Esta localización sugiere, por supuesto, la existencia de alguna interrelación funcional entre estas 3 estructuras.

Bajo condiciones de privación de carbono (acetato), el cuerpo de Golgi se hipertrofia, apareciendo distensiones saculares en ambos extremos de la cisterna dando así lugar a la formación de numerosas vesículas y vacuolas que se mueven en el citoplasma.

El aplanamiento y fusión de estas vacuolas da como resultado el aislamiento de algunas mitocondrias y otros componentes citoplasmáticos dentro de dichas vacuolas unidas a membrana; comparable a los citolisomas o vacuolas autofágicas descriptas en células mamíferas, como ya se mencionó al hablar de las mitocondrias.

El material encapsulado es luego progresivamente hidrolizado; el cuerpo de Golgi parece cumplir el papel de una hidrolasa ácida, la fosfatasa ácida.

Este proceso de autodigestión representa, probablemente, un mecanismo para proveer a la célula de productos de degradación, los cuales serían así utilizados para mantener los procesos metabólicos basales durante la privación de fuentes externas o ayuno.

II.10.-RETICULO ENDOPLASMATICO Y RIBOSOMAS

El citoplasma de E. gracilis contiene un sistema de túbulos y vesículas limitadas por la membrana que constituye el retículo endoplasmático.

Si bien los estudios realizados reportan la presencia de elementos vesiculares y tubulares discretos con una superficie tanto lisa como rugosa (con ribosomas), la mayoría del retículo endoplasmático parece ser del tipo liso.

También se encuentra una gran cantidad de ribosomas distribuídos en todo el citoplasma. Micrografías electrónicas de células de E. gracilis, privadas de una fuente de carbono, muestran una pronunciada vacuolización del retículo endoplasmático, consecuencia del agotamiento de gránulos de paramilón.

Trabajos posteriores modificaron esta interpretación; si bien la vacuolización del citoplasma efectivamente se produce, las cavidades que contienen paramilón, por lo menos en células privadas de una fuente de carbono exógenas, parecerían ser independientes del retículo endoplasmático.

Por lo tanto las grandes vacuolas confluentes encontradas en células de Euglena crecidas en esas condiciones, parecen derivar de la fusión de cavidades, cuyo contenido de paramilón se ha agotado, con vacuolas de paredes complejas y citolisomas vacíos, antes que de una hinchazón o engrosamiento del retículo endoplasmático.

En E. gracilis, el retículo endoplasmático interconecta el núcleo, cloroplastos y cuerpos de mucus subpeliculares (ver más adelante).

II.11.- CLOROPLASTOS Y PIRENOIDES

Los cloroplastos de E. gracilis están atravesados por bandas moderadamente densas o lamelas (10 a 45), que varían en su espesor d sde 27 a 210 mu. Cada una es un paquete o grupo de 2 a 5 (usualmente 3) discos; la matriz está constituída por un material irregularmente granular en la cual yacen las bandas de discos.

También suelen encontrarse gotas lipídicas y, ocasionalmente, vacuolas vacías.

El pirenoide, que está como recubierto de paramilón, es una región de la matriz, de material más denso, atravesado por bandas ampliamente espaciadas consistiendo cada una a su vez de un disco simple o doble.

El tamaño del pirenoide varía considerablemente y aparentemente depende, en parte, del estado de desarrollo del cloroplasto.

Usualmente, el cloroplasto se encuentra rodeado por una densa membrana la cual puede ser resuelta a su vez, en dos membranas.

Los cloroplastos de E. gracilis contienen una única especie de DNA y existen evidencias, hoy en día comprobadas, de la presencia de RNA.

Los ribosomas cloroplásticos son más pequeños que los citoplasmáticos; además se debe agregar que los cloroplastos parecerían estar conectados con el núcleo vía el retículo endoplasmático.

II.12.- RIZOPLASTO

Es una delgada fibra de conexión que se extiende desde uno de los kinetosomas a un gránulo ubicado en la membrana nuclear. Su presencia en las diferentes especies de Euglena está aún discutida.

II.13.- PARAMILON

Es el carbohidrato de reserva que se encuentra en general en todos los euglenoides. Es un polisácarido incoloro, iodoforo y que puede ser hidrolizado a d-glucosa, siendo su estructura la correspondiente a un 1-3 β-glucano.

Los gránulos de paramilón varían en número, tamaño, forma y localización intracelular según la especie.

Por ejemplo, pueden estar dispersos en el citoplasma (E. gracilis var. bacilaris); pueden estar asociados al pirenoide (E. gracilis Klebs); pueden estar agrupados (E. viridis); o ser pocos, pero grandes y localizados en una zona determinada (E. spirogyra). Además, los gránulos pueden tener forma de disco, ser anulares o alargados.

La clase de cuerpos de paramilón producidos por una dada especie de Euglena es usado como criterio taxonómico; así la cantidad de los mismos.

Algunas especies poseen tantos cuerpos de paramilón asociados al cromatóforo como libres en el citoplasma, como ocurre en E. gracilis y E. sanguinea.

Como se verá más adelante, los gránulos de paramilón aumentan en número en células de E. gracilis crecidas en un medio que contiene un exceso de carbono (acetato) y disminuyen cuando falta la fuente de carbono.

Recordaremos aquí que alrededor de los mismos se encuentra una actividad constitutiva de fosfatasa ácida.

II.14.- CUERPOS DE MUCUS

Son cuerpos subpeliculares esféricos o elongados, presentes en varias especies de Euglena. Aparentemente contribuyen a la formación de la capa gelatinosa, especialmente luego de la irritación de la célula; dentro de esta capa las células se mantienen inmóviles. La formación de esta capa se produciría a partir de la secreción de mucina por estos cuerpos en forma de fibras delgadas y lustrosas las cuales se fusionan perpendicularmente formando como cuerdas a lo largo de las estrías peliculares de la célula.

En E. gracilis el espacio perinuclear, el retículo endoplasmático y los cuerpos de mucus forman un sistema continuo.

II.15.- QUISTES

A pesar de que la presencia de los cuerpos de mucus en E. gracilis ha sido negada por algunos autores, parece haber coincidencia en el hecho de que algunas células en ciertas condiciones ambientales, forman una capa o quiste, especialmente en un medio que contenga etanol a pHs entre 7 y 5. A pHs más ácidos no se forma; dentro del quiste la célula puede dividirse.

Estos quistes son usualmente esféricos, pero pueden tener también forma de pomo o botella, o ser pentagonales, según la especie.

Euglena puede formar diferentes tipos de quistes y Jahn (1951) los ha clasificado en: quistes protectores, reproductivos, temporarios, de reposo o transitorios y quistes de pared delgada. Algunas especies de Euglena pueden formar más de una forma de estos quistes durante su ciclo de vida; específicamente E.gracilis forma tanto quistes reproductivos como temporarios. Los quistes reproductivos están formados por una membrana delgada y elástica que aumenta de tamaño a medida que la célula se divide; pueden contener, cada uno, de 32 a 64 células, las cuales son noflageladas. Los quistes temporarios, en cambio, tienen una pared impermeable al agua, pero que posee un poro pequeño; la célula permanece flagelada y puede así moverse dentro de la cavidad. Se forman en respuesta a la exposición a la luz solar fuerte o a temperaturas de 10-12°C y su función es evidentemente la de proteger las células de la desecación.

Finalmente, también pueden observarse en el citoplasma diferentes tipos de inclusiones celulares: conglomerados vacuolares grandes, cuerpos marrones-anaranjados que se pueden originar a partir de cloroplastos en degeneración, en cultivos viejos o en células tratadas con estreptomicina bajo condiciones en las cuales no crecen cuerpos densos y esféricos que, según algunos autores serían lípidos o gránulos dispersos del "eyespot", etc.

II.16.- NUCLEO

El núcleo (en interfase) se encuentra en la región central o posterior de la célula pero puede moverse y cambiar su forma durante el movimiento euglenoide.

Es esférico en las células en forma de huso y ovoide en las elongadas. Según Chu (1947) existe una relación entre su tamaño y el de la célula.

En interfase los cromosomas están condensados y los endosomas o nucleolos son perfectamente visibles; la cromatina se encuentra en forma de gránulos o filamentos. Generalmente al nucleolo se lo denomina endosoma, a pesar de que su composición química es semejante a la de los nucleolos de organismos superiores, debido a que durante la mitosis no desaparece, sino que permanece, se divide y retiene el RNA.

El endosoma tiene RNA, pero no así DNA; a pesar de que O'Donnell (1965) identificó una fina estructura de ácido nucleico que era susceptible a la degradación por DNA-asa.

Hay discrepancias entre los diversos autores con respecto a la presencia o no de los organizadores nucleolares; como así también si las células son haploides o diploides. Como en los organismos superiores, el núcleo posee una estructura de doble unidad de membrana con poros circulares que conectan el núcleoplasma con la matriz del citoplasma. Se ha comprobado que en E. gracilis ocurre mitosis; sólo en 3 especies de Euglena (E. spirogyra, E. acus y E. viridis) ha sido descripta la amitosis o sea la división del núcleo sin división de los cromosomas.

Hasta el momento, no se cuenta con evidencias valederas y suficientes en cuanto a una sexualidad comprobada en Euglena; por lo tanto tiene lugar la mitosis sin meiosis (salvo algunas observaciones de conjugación y formación de zigotos que no fueron reproducibles). No obstante, permanece latente la posibilidad de que ésta ocurra en algunos casos excepcionales pero, de todos modos, un proceso sexual no es una característica normal ni regular del ciclo de vida del género Euglena.

III.- CULTIVO Y CRECIMIENTO DE EUGLENA

III.1.- INTRODUCCION

Las propiedades de Euglena dependen, en gran parte, de las condiciones empleadas en el cultivo. Así, E. gracilis puede ser grande o pequeña, amarilla o verde y puede dividirse rápida o lentamente, según los planes del investigador.

La flexibilidad fisiológica y bioquímica de Euglena, unida a su flexibilidad morfológica justifica, indudablemente, su "creciente popularidad" entre sus estudiosos, como un organismo sumamente útil para una amplia gama de investigaciones bioquímicas. Una de las grandes ventajas de trabajar con Euglena reside en que sus requerimientos químicos son simpels; sin embargo, el medio ambiente debe ser rigurosamente controlado con respecto a los factores tanto físicos como químicos, así, el medio puede ser modificado químicamente pero en una forma y un grado conocidos.

Por lo tanto se deben emplear cultivos "axénicos" (puros) ya que además de los cambios producidos en el medio por los contaminantes que modificarán las características de Euglena, las propiedades fisiológicas de esa población mezcla tienen escaso significado en términos de una fisiología euglenoide pura. Los pHs bajos (3-5) ayudan a prevenir la contaminación por la mayoría de los microorganismos. Los contaminantes usuales del laboratorio son bacterias y hongos; las bacterias tienen, frecuentemente, velocidades de crecimiento mucho mayores que las células de Euglena, produciendo un agotamiento rápido del medio e inhibiendo así el crecimiento de ésta última.

Entre los diversos métodos para la obtención de cultivos axénicos, el más importante es quizás, el uso de antibióticos o drogas que maten o reduzcan la velocidad de crecimiento de los contaminantes; pero, por supuesto que permitan el crecimiento de las células de Euglena.

Los antibióticos preferidos para tal fin son la penicilina y la estreptomicina. También Bowne (1964) demostró que Euglena es más resistente a la cafeína que la mayoría de los microorganismos, proponiendo su uso para la obtención de cultivos axénicos.

Por supuesto, el empleo de antibióticos, en este caso, debe ser rigurosamente controlado, ya que como veremos luego, si se agregan en concentraciones mayores que un determinado valor, que varía según la especie, afectarán también la morfología y fisiología de las células de Euglena. A pesar de que existen diferencias entre las distintas especies en cuanto al grado de resistencia a los antibióticos, su uso resulta efectivo porque Euglena es más resistente que la mayoría de los contaminantes comunes.

III.2.- TECNICAS DE CULTIVO

Generalmente, Euglena se hace crecer en medio líquido, pero la mayoría de las cepas pueden crecer en medios semisólidos o sólidos. Los cultivos

III.4 stock se pueden mantener tanto en agar como en medio líquido, siendo preferible
III.4 el primero; tubos con 1-2% de peptona soportan (o mantienen) bien el crecimiento de la mayoría de las cepas de Euglena y si estos se conservan a 14-15°C no es necesario hacer repiques muy frecuentes. (Figura 53).

Por ejemplo, E. gracilis Z no requiere más que un repique mensual.

La luz no es esencial para el mantenimiento de los cultivos stocks, salvo el caso de fotótrofos obligados; se han mantenido cultivos stocks de E. gracilis Z en la oscuridad, durante 10 años sin pérdida de su capacidad fotosintética.

Es posible obtener también cultivos sincrónicos, siendo fundamentalmente dos los métodos empleados:

III.2.1. Sincronización por luz

Si cultivos de Euglena se hacen crecer en ciclos diurnos de luz-oscuridad, fotoautotróficamente, o sea dependientes de la fotosíntesis, las células se dividen durante los ciclos de oscuridad. Bajo condiciones heterotróficas, crecimiento en ausencia de luz, la sincronización por este método no es aconsejable.

En este método, que permite la sincronización en el laboratorio, la temperatura debe mantenerse constante. Si se eligen apropiadamente la duración de los períodos de luz-oscuridad, cerca del 100% de las células se dividirán en cada ciclo, durante los períodos de oscuridad.

Por supuesto, la elección de las condiciones óptimas depende de la cepa empleada; así, para E. gracilis Z se encontró que éstas correspondían a una temperatura de 21,5°C y ciclos de luz-oscuridad de 14-10 horas (Cook y Hess, 1964; Cook, 1966 a).

III.2.2. Sincronización por temperatura

a) Shocks de calor:

Pogo y Arce (1964) han reportado que si E. gracilis Z se hace crecer heterotróficamente en un medio orgánico complejo, las células se dividen sincrónicamente luego de ser sometidas a shocks de temperaturas supraóptimas. Este régimen consiste en un tratamiento durante 11 horas a 24°C y 13 horas a temperaturas mayores; temperaturas de 36-38°C bloquean la división celular, mientras que el número de células se duplica en cada período a 24°C. Shocks de temperaturas a 35°C o menores no son efectivos para sincronizar la división celular.

Estos autores encontraron además que la sincronización por shocks calientes no alteran el crecimiento celular medido en función del aumento del volumen.

b) Shocks fríos:

El crecimiento de E. gracilis Z también se puede sincronizar por un desplazamiento de la temperatura óptima (28-30°C) a temperaturas menores, las cuales bloquean la división celular. En este caso, el número de células se duplica en los períodos calientes.

Neal, Funkhouser y Price (1968) reportaron la sincronización de Euglena crecida heterotróficamente en la oscuridad por shocks de temperatura de 18 horas a 14,5°C y 6 horas a 28,5°C, sin que las células resulten afectadas como lo demostraba el hecho de que las células eran capaces de formar cloroplastos a una velocidad normal, cuando eran colocadas en presencia de luz.

El método a) tiene la desventaja que emplea temperaturas que blanquean las células; Pogo y Arce (1964) reportaron que 7 shocks de calor a 37°C daban como resultado un 14% de células blanqueadas; este efecto, por lo tanto, limita la utilidad del método.

III.3.- COMPOSICION QUIMICA BASICA

El perfil bioquímico de Euglena depende, en gran parte, de las condiciones del cultivo y la etapa del crecimiento en que las células se encuentren.

La Tabla 6 resume la composición bioquímica de E. gracilis; los valores son promedios de los hallados para células crecidas en una amplia variedad de condiciones. Se puede observar que el contenido de DNA comprende el 2-4% de la masa total, dependiendo de la forma en que se hagan crecer las células. El DNA cloroplástico es aproximadamente un 3% del DNA total y contiene un 75% de A + T, en contraste con el DNA nuclear que contiene un 45-50% de A + T.

Tabla 6

Composición química básica de E. gracilis

FRACCION	mg/10^6 células
Peso seco	0,7 - 1.0
Proteína	0,2 - 0,4
Paramilón	0,04- 0,4
Lípido	0,11- 0,3
Clorofila	0 - 0,035
RNA	0,015-0,045
DNA	0,0027[a]-0,0043[b]

a: E. gracilis Z

b: E. gracilis var. bacillaris SM-L1

III.4.- REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO DE EUGLENA

III.4.1 Inorgánicos:

a) Azufre: la mayoría de las células animales requieren azufre en proporciones relativamente reducidas; pero Euglena, como ocurre con las plantas superiores y varios microorganismos, utiliza sulfato tanto en la luz como en la oscuridad.

La metionina sirve igual que el sulfato en términos de densidad celular final, cisteína y homocisteína mantienen el crecimiento pero éste llega a niveles finales reducidos, mientras que taurina y el ácido homicisteico no son fuentes apropiadas para el crecimiento de Euglena (Buetow, 1965).

Kemper y Miller (1965, b) y Buetow (1965) estudiaron la distribución de ^{35}S en Euglena, encontrando que la proteína contiene un 40-50% del azufre total, mientras que los solventes de lípidos removían un 5-15% de la marca total y la fracción de ácidos nucleicos contenía un 10-25%.

Goodman y Schiff (1964) analizaron los productos formados por Euglena gracilis a partir de sulfato radioactivo y encontraron en los pools solubles, cisteína, cistina y glutation pero no metionina, ni homocisteína, ni adenosil metionina. Los autores sugieren que en Euglena la concentración de metionina libre debe ser demasiado pequeña como para detectarla debido a la elevada demanda de síntesis proteica considerando que este aminoácido es un constituyente presente en todas las proteínas de Euglena.

También se han encontrado en este organismo nucleótidos o nucleótidos-péptidos que contienen azufre, Abrahan y Bachhawat (1965) reportaron la presencia en Euglena de 3-fosfoadenosina-5 fosfosulfato o "sulfato activo" (PAPS). Por otro lado, los lípidos contienen una cantidad importante del azufre total incorporado por Euglena. El sulfolípido más importante en las células fotosintéticas es el 6-sulfo-6 deoxi-α-D-glucopiranosil-1, 1-diglicérido ó 6-sulfoquinorosil diglicérido, siendo sus principales componentes ácidos grasos, el palmítico y linoleico.

Benson et al (1962) demostraron que los niveles de este sulfolípido son bajos en células etioladas de Euglena, aumentando su contenido con el enverdecimiento, o sea, cuando las células se exponen a la luz.

Se sugirió entonces que el sulfolípido sería un componente importante de las estructuras fotosintéticas activas y estaría íntimamente relacionado al metabolismo de los carbohidratos del cloroplasto.

Davies et al (1966) demostraron que el azufre del ácido cisteico puede ser empleado por Euglena como fuente de las unidades C-S para la biosíntesis de este sulfolípido, mientras que el azufre de la cisteína no es incorporado en dicho compuesto.

Ya en 1965 Davies et al habían determinado que la cantidad del sulfolípido en Euglena crecida a la luz era 5 veces mayor que la de células crecidas a la oscuridad, a pesar que la incorporación total de ^{35}S era aproximadamente igual en ambos casos.

También encontraron que el molibdato inhibía la incorporación de sulfato en el sulfolípido y por lo tanto, considerando que el molibdato inhibe la formación de adenosina 5-sulfo-fosfato y por ende la del PAPS, Davies et al (1966) sugieren que en Euglena el PAPS estaría involucrado en el camino biosintético sulfato ⟶ sulfolípido.

Los resultados de Abraham y Bachhawat (1965) coinciden con los de Davies et al (1966) ya que hallaron que la velocidad de incorporación de sulfato por células de Euglena es mayor en aquellas células fotosintéticas que en las etioladas y aún mucho mayor que la encontrada en Euglena blanqueada con estreptomicina.

La estimulación de la incorporación de sulfato por la luz y el hecho de que ésta sea inhibida por dinitrofenol y azida implica que éste es un proceso que requiere energía, lo cual está de acuerdo con el hecho de que la reducción de sulfato en E. gracilis, así como en otros microorganismos, involucra la formación inicial de un intermediario de alta energía o sea el PAPS.

Por último se ha observado que los nucleótidos azufrados constituyen compuestos de gran importancia en la mitosis o división celular de estos flagelados.

b) Hierro: el hierro, como ha sido demostrado hace ya varios años por distintos investigadores, es un elemento esencial para el crecimiento y la formación de clorofila en las plantas superiores y en bacterias fotosintéticas.

E. gracilis es un microorganismo apropiado para aquellos estudios que involucren la participación de metales en muy pequeñas cantidades, ya que combina ciertas características favorables de las plantes superiores y los microorganismos. Por ejemplo dos de ellas son: el contenido o concentración del metal puede ser rigurosamente controlado y las células se pueden romper cuantitativamente obteniéndose, no obstante, un amplio espectro de enzimas altamente activas.

O sea, E. gracilis es un sistema ventajoso y muy apropiado para el estudio de los medios por los cuales un ión inorgánico controla un proceso metabólico.

Price y Carell (1964) en un estudio sobre el control del Fe sobre el crecimiento y síntesis de Euglena gracilis Z, encontraron que aún las drogas químicas más puras contenían suficiente cantidad de Fe, como trazas contaminantes como para mantener cierto grado de crecimiento de Euglena.

Además cuando E. gracilis se hace crecer primero en presencia de intensidades de luz bajas y luego se la ilumina con intensidades altas de luz en un buffer no nutriente, las células sintetizan clorogila rápidamente, con una dependencia absoluta del contenido de hierro de las células.

El crecimiento también depende de la concentración de Fe intracelular, pero los autores encontraron que podían sintetizar clorofila independientemente del crecimiento.

Este hecho, sumado a la observación de que células que habían crecido a velocidades normales sintetizaban clorofila en pequeñas cantidades, sugieren que el Fe requerido para el crecimiento estaría asociado a sitios distintos de aquellos en los cuales actuaría el Fe requerido para la síntesis de clorofila.

Price y Carell (1964) demostraron también que la formación de clorofila en células deficientes en Fe, es inducida por el agregado del metal, pero no de otros componentes del medio (etanol, glutamato, etc.) de crecimiento; por lo tanto parecería que la "lesión" provocada por la falta de hierro es parcial y específicamente reversible, parcial pues el agregado del metal no disminuye el lag que se observa en la formación de clorofila en células deficientes en Fe. Es importante recalcar que la concentración de Fe requerida para dicha síntesis es mayor que la requerida para el crecimiento de las células.

Por último, Price y Carell (1964) observaron que la velocidad de síntesis de clorofila aumenta linealmente, con el aumento del contenido de hierro de las células, desde cero hasta un valor saturante del mismo, luego del cual la velocidad permanece constante en un rango de concentración de Fe hasta 20 veces mayor que el valor de saturación.

c) Zinc: los investigadores que se han dedicado al estudio de los efectos ocasionados en el metabolismo de los microorganismos por la deficiencia de Zn han considerado que Euglena gracilis es también, en este caso, un organismo sumamente apropiado para telas estudios.

Esto se debe, según Wacker (1962), a que este alga-protozoo reúne las siguientes características: una nutrición "plant-like", la cual permite controlar perfectamente el contenido del metal en el medio de crecimiento y en el interior de las células; éstas pueden romperse fácilmente y permiten un aislamiento y caracterización rápidas del material subcelular; un crecimiento y metabolismo vigoroso con lo cual se amplifican las alteraciones producidas por la deficiencia del metal; homogeneidad de las poblaciones celulares que permite interpretaciones claras y sin ambiguedades de los cambios analíticos y funcionales ocasionados por la deficiencia y finalmente a estas condiciones se agrega la facilidad de crecimiento de Euglena gracilis en un medio definido simple del cual los metales pueden removerse fácilmente.

Price y Vallee (1962) confirmaron las ideas anteriores considerando además a Euglena gracilis definitivamente como el organismo más apropiado para el estudio del metabolismo del zinc.

Estos autores demostraron que cuando no se agrega zinc al medio, resulta un crecimiento muy bajo de Euglena, en estos casos el contenido de este metal era un 5% o menos que el correspondiente a células controles crecidas en presencia de zinc.

La densidad celular final alcanzada por poblaciones de E. gracilis Z es una función lineal del Zinc inicialmente presente en el medio de crecimiento en un rango de 0-15 gr/l. El estudio realizado por Price y Vallee (1962), con respecto al análisis de los otros metales nutrientes, indica que únicamente el Zinc limita el crecimiento de E. gracilis.

Puesto que las metalo-enzimas dependientes de piridín-nucleótidos son zinc-metaloenzimas Millar y Price (1960) y Price y Millar (1962), estudiaron la posibilidad de que bajos niveles de este metal limiten el crecimiento debido a una reducción en la respiración. Sin embargo, estos autores hallaron que el consumo de oxígeno, en condiciones de deficiencia de Zinc, era lo suficientemente elevado como para mantener un crecimiento aún mayor que el observado.

Concluyen finalmente, que la velocidad de oxidación del etanol determinada en deficiencia de Zinc no explicaba el cese del crecimiento de las células.

Posiblemente, las dehidrogenasas piridín-nucleótico dependientes estén presentes en concentraciones relativamente grandes aún en células de Euglena deficientes en Zn.

Sin embargo Price (1961) demostró que la actividad de la D-lactato dehidrogenasa está disminuída en E. gracilis Z crecida en un medio deficiente en este metal.

Wacker (1962) estudió los cambios que se producían en el contenido de ácidos nucleicos, proteínas y otros metales en células de E. gracilis crecidas en un medio deficiente en Zn. Además de la severa reducción en el crecimiento ya demostrado por Price y Vallee (1962), encontró que la deficiencia de este elemento estaba también acompañada por grandes cambios en el contenido de proteínas y ácidos nucleicos de estos organismos.

La lesión resultante de la deficiencia de Zn consistía en una severa alteración en la síntesis de proteínas, sugerida además por un significativo incremento en el contenido de aminoácidos y una disminución en el correspondiente a RNA y proteínas.

Además, el aumento del tamaño de las células y la duplicación del contenido de DNA demostraba una inhibición de la mitosis como consecuencia de tal deficiencia.

Según Wacker (1962) estos resultados permiten postular que los efectos observados en el metabolismo de las proteínas y ácidos nucleicos son una consecuencia directa de la deficiencia de Zn en el RNA de estos organismos. No obstante puesto que este metal es un componente funcional de varias enzimas, es posible según este autor, que su deficiencia ocasione algún defecto enzimático aún desconocido en la síntesis de un componente incolucrado en el proceso de síntesis proteica.

Wacker (1962) demostró claramente que los efectos ocasionados por la deficiencia de Zn no son revertidos por el agregado de aminoácidos, purinas, pirimidinas u otros nucleótidos, lo cual sugiere que dichos efectos no provienen, primariamente por lo menos, de un defecto en la síntesis de estos precursores.

Los efectos producidos por la deficiencia de este elemento tampoco constituyen simplemente una falla del metabolismo oxidativo que provee energía para estos procesos (la cual podría ser insuficiente), puesto que se encuentra una acumulación masiva de polifosfatos insolubles en ácidos, lo cual constituye una de las principales características de las células deficientes.

Estudios en varias especies microbianas han demostrado que el polifosfato es sintetizado a partir de ATP. Por lo tanto, la acumulación de estos compuestos de alta energía en las células deficientes es una evidencia que, posiblemente, estén compitiendo sistemas generadores de energía. Esta acumulación de polifosfato se ha considerado en otros trabajos previos (Mudd et al, 1958), como la consecuencia específica de un bloqueo o inhibición en su utilización en la síntesis de RNA y proteínas.

Algunos estudios apoyarían la hipótesis, de que la alteración producida, sería entonces una falla en la síntesis proteica.

También Wacker (1962) encontró además que la deficiencia de Zn modificaba marcadamente el contenido de otros metales en las células. Así, a medida que disminuye la concentración de Zn, aumenta la correspondiente a otros metales; particularmente, el contenido de Mn aumenta 60 veces en células de Euglena fotosintetizante deficiente en Zinc.

Finalmente Wacker (1962) sugiere que las lesiones características de la deficiencia de zinc, reflejan la participación de este metal en el proceso sintético que lleva de RNA a proteínas.

En 1971, Knezck et al estudiaron la influencia de la cantidad y la fuente de Fe agregados al medio de crecimiento de E. gracilis, sobre su contenido de Fe, Cu, Mn y N sobre el crecimiento de las células.

Encontraron que el uso de Fe E-DDHA (quelato férrico del ácido etilendiaminodil (o-hidroxifenilacético) promovía la división celular mientras que el empleo de $FeSO_4$ - 7 H_2O inducía un agrandamiento celular, luego de 7 días, encontrándose en el primer caso un mayor contenido de Nitrógeno.

El contenido de Cu estaba directamente relacionado con el tamaño celular, siendo mayor en las células más grandes; la incorporación de Mn estaba inversamente relacionada con la fuente de Fe, el SO_4Fe la inhibía en mayor grado que el quelato.

La incorporación de Fe era similar para ambas fuentes del metal cuando se agregaba cantidades pequeñas (1 ppm); mientras que el contenido de Fe intracelular era mucho mayor a partir de la fuente inorgánica cuando se trabajaba a concentraciones mayores adicionadas al medio (10 ppm).

Prosk y Donald (1971), observaron que la deficiencia de Zn, en E. gracilis Z crecida en ausencia de luz, resultaba en la desaparición de los ribosomas citoplasmáticos; en cambio en células con un contenido suficiente de Zn, éstos se encuentran presentes y pueden ser observados en cualquier etapa del crecimiento.

Los autores postulan que la desaparición de los ribosomas estaría involucrado en un proceso de desintegración generalizado relacionado al bajo contenido de Zn en los ribosomas; su reaparición requiere la adición del metal. Estos hechos ya habían sido observados por Wacker et al (1962), como se describió antes.

Prosk y Donald (1971) consideran que una adecuada o apropiada cantidad de Zn debe ser esencial para mantener una estructura terciaria y cuaternaria normales de los ribosomas citoplasmáticos de E. gracilis.

En un estudio reciente Nakano et al (1978) estudiaron las actividades biológicas del Zn y el Cd en Euglena gracilis Z crecida en medios deficientes en Zn y en medios que contenían el metal.

El Cd no está involucrado en el metabolismo celular normal en E. gracilis crecida en medios deficientes en Zn, ni tampoco lo reemplaza, siendo el Zn como ya vimos, un elemento esencial para el normal crecimiento de las células.

El antagonismo entre ambos metales se evidencia en las áreas correspondientes al crecimiento, tamaño celular y en la incorporación del Cd en las células. Este penetra mucho más fácilmente en un medio deficiente en Zn y por lo tanto, su toxicidad es mayor en estos medios que en aquellos cuyo contenido de Zn es normal; es en este sentido que se considera que la toxicidad del Cd es reducida por el Zn, como resultado de un menor contenido de Cd intracelular. Por el contrario, el Cd no induce una deficiencia del otro metal en medios normales en cuanto a su contenido en Zn.

Los efectos tóxicos del Cd se evidencian morfológicamente en una inhibición (arrest) de la fisión celular, observándose entonces, células anormales.

Algunas de las alteraciones producidas por la presencia de Cd en E. gracilis se asemejan a las que se encuentran también en medios deficientes en vit. B_{12}; la diferencia entre ambos casos es que el Cd a diferencia de la vit. B_{12}, no inhibe la síntesis de DNA en E. gracilis.

Los autores concluyen, por lo tanto, que si bien el mecanismo de la acción tóxica del Cd no está aún bien aclarada, el comportamiento de las células anormales resultantes del tratamiento con este metal, sugieren que éste puede afectar el mecanismo de la división celular de E. gracilis.

d) Magnesio: las células deficientes en Mg de varias algas fotosintéticas, incluyendo E. gracilis, presentan un tamaño mayor que el de las células normales como resultado del cese de la división celular y la continuación del crecimiento citoplasmático.

En 1955, Wolken et al demostraron que células de Euglena, luego de 3 transferencias en medios deficientes en Mg, adoptaban una forma esférica (8-10u) y eran incoloras.

Más tarde Dubash y Rege (1967) estudiaron el efecto de la deficiencia de Mg sobre el crecimiento, en presencia y ausencia de luz, de células de Euglena gracilis, en un medio suplementado con 1% de glucosa.

Coincidiendo con los resultados ya descriptos por otros autores, encontraron que las células crecidas a la luz tenían un tamaño mayor; una velocidad menor de multiplicación y tendían a depositarse en el fondo y habían perdido su motilidad.

Por lo tanto, en este caso, la luz ejercía un efecto tóxico. Así, a pesar que en la oscuridad la glucosa puede subsanar la deficiencia de Mg y de fotosíntesis y en la luz puede actuar sinergísticamente con la fotosíntesis, no puede reemplazarla completamente mientras las células posean cloroplastos capaces de sintetizar clorofila.

Las células crecidas en la oscuridad que no muestran, aparentemente, una dependencia de la disponibilidad de Mg, presentan sin embargo, profundos cambios cuando son privadas de una fuente de Mg por tiempos prolongados, mediante repiques (5 ó 6) en la oscuridad en un medio sin Mg. Estas células sin Mg perdieron para siempre su capacidad de regenerar los cloroplastos, aunque luego se las transfiera a un medio con Mg en presencia de luz.

Además, lo más sorprendente es que estas mutantes blanqueadas de Euglena por privación de Mg, pueden ahora obtener energía a partir de la glucosa exógena para crecer en presencia de luz y en un medio deficiente en Mg. Por lo tanto, la toxicidad de la luz es así específica sólo para aquellas células verdes que contienen cloroplastos.

El blanqueamiento permanente de Euglena por privación de Mg parecería ser aparentemente, un caso indirecto de mutación citoplasmática; la irreversibilidad de este efecto indicaría, según Dubash y Rege (1967), que en estas células el DNA satélite (presente en aquellas capaces de formar cloroplastos y ausente en las que carecen de tal propiedad) ya no existe ó, por lo menos, no sería funcionalmente activo.

Por lo tanto, el Mg parecería cumplir un rol importante en la conservación de la capacidad potencial sintetizante de clorofila. Prueba de ello es que células adaptadas a crecer en oscuridad durante 6 años, en un medio con Mg aún retienen trazas significativas de clorofila y la habilidad de resintetizarla si son expuestas a la luz; sin duda, el Mg está asociado con la conservación de la estructura del proplástido.

Zielinski y Prince (1977) estudiaron las relaciones entre el Mg, crecimiento, síntesis proteica y el contenido de polisomas citoplasmáticos en Euglena gracilis Z crecida en medios con diferentes concentraciones de Mh. Hallaron que

todos los valores de concentraciones empleadas, tanto la síntesis de clorofila como la de proteínas seguían una cinética exponencial. Además las velocidades aparentes de síntesis y los rendimientos finales de ambos eran mayores a las concentraciones más elevadas empleadas, pero la velocidad de síntesis de clorofila excedía siempre la formación de proteínas, es decir, las células más deficientes en Mg contenían, proporcionalmente, más clorofila que las no deficientes.

Por otro lado, los polisomas citoplasmáticos aislados de células deficientes en Mg presentaban las mismas características que los polisomas provenientes de las células controles.

Los autores concluyeron, por lo tanto, que la disminución de la velocidad de la síntesis proteica precede, y es posiblemente la causa de la disminución de la velocidad de síntesis de clorofila; pero que el mecanismo de tales efectos (o de esta inhibición) permanece aún sin esclarecerse.

e) Nitrógeno: los estudios iniciales indicaban, en general, que las sales de amonio eran mejores fuentes de nitrógeno que las sales de nitrato.

Cramer y Myers (1952) estudiaron este problema bajo condiciones más controladas; empleando E. gracilis y encontraron un crecimiento pobre con nitrato, tanto en luz como en oscuridad; empleando butirato como fuente de carbono en el segundo caso.

Huzisige y Satah (1960) reportaron que el nitrito no podía sostener la multiplicación celular de E. gracilis; por otro lado células crecidas con amonio como fuente de nitrógeno presentaban actividades elevadas de nitrito reductasa.

La velocidad de reducción de nitrito, que es de tipo asimilativo, se aceleraba en presencia de luz o por adición de un donor exógeno de protones, de los cuales el malato resultó ser el más efectivo. En ausencia de un donor de protones, la aereación también aumentaba la velocidad de reducción; si ésta estaba presente dicha velocidad era menor que la encontrada en los controles no aireados que contenían malato.

La reducción de nitrito o nitrato se sabe que está relacionada con la maquinaria respiratoria y el aparato fotosintético en muchos sistemas celulares, por lo tanto, es muy probable que en Euglena este proceso desempeñe un rol importante en las funciones respiratorias y fotosintéticas, además de intervenir en la multiplicación celular.

Frecuentemente se agregan aminoácidos al medio de cultivo como fuentes de carbono; Buetow (1966) demostró que algunos aminoácidos, pero no todos, también sirven como fuente de nitrógeno para algunas cepas de E. gracilis. Los más apropiados, en cuanto a crecimiento celular se refiere, son los aminoácidos alifáticos neutros y los dicarboxílicos (y sus amidas); siendo el ácido glutámico la fuente de nitrógeno de este grupo. No sirven como tal los aminoácidos aromáticos, los básicos y aquellos que tienen en su estructura un grupo amino secundario o azufre.

Es de interés aclarar que se ha observado que si bien algunos aminoácidos no sirven como fuente de nitrógeno, pueden penetrar perfectamente bien en las células de Euglena.

Kemper y Miller (1965), en un estudio realizado en E. gracilis Z, crecidas heterotróficamente con glutamato como principal fuente de carbono y con trazas de aminoácidos radioactivos incorporados al medio de cultivo, logró identificar 15 de los aminoácidos más comunes en hidrolizados proteicos. Algunos de ellos, como aspartato, glicina, serina, treonina son convertidos en otros aminoácidos diferentes; mientras que otros, como alanina, histidina, prolina, fenilalanina, tirosina, valina; son incorporados en las proteínas sin previa metabolización.

f) Fósforo: el fósforo es otro de los requerimientos para el crecimiento de E. gracilis. Albaum et al (1950) identificaron casi una docena de compuestos fosforados en Euglena, incluyendo varios intermediarios fosforilados de la glicólisis así como también metafosfatos y pirofosfatos inorgánicos.

Además, gránulos de polifosfatos (volutina) se encuentran distribuídos en todo el citoplasma, pero no en el núcleo. Contrariamente a lo ocurrido en otras algas, Smillie y Knotkov (1960), hallaron que los niveles de polifosfatos en E. gracilis Z eran considerablemente más elevados cuando la síntesis plástida estaba reprimida.

El contenido total de fósforo en Euglena también varía con las condiciones de crecimiento, no estando en general correlacionado con la velocidad de crecimiento, si se lo expresa en función del peso seco. Como éste también varía con las condiciones de crecimiento del cultivo, cuando los datos son expresados por célula (referido al contenido de DNA), se observan diferencias menores en el contenido de fósforo total en células crecidas en distintas condiciones experimentales (crecimiento autotrófico, heterotrófico; en luz, oscuridad, etc.). Sin embargo, en células blanqueadas crecidas a la luz con una fuente orgánica de carbono, el contenido de fósforo era el doble, adjudicando la diferencia al mayor contenido de fósforo soluble en ácido y de los polifosfatos; los autores sugieren que esto a su vez se debe a los bajos niveles de síntesis de RNA en células blanqueadas ya que el RNA contiene la mayor fracción de fósforo total en Euglena, junto con los lípidos.

Como ya se mencionó antes, la privación de fosfato induce la síntesis de una fosfatasa ácida (Blum, 1965; Price, 1962), la cual está localizada en la superficie celular.

Los resultados de Blum (1966) sugieren que la incorporación de fosfato es un proceso de transporte activo involucrando quizás una fosfatasa inducible. Además, según el autor, se pueden encontrar condiciones experimentales que inhiban la incorporación de fosfato sin interferir con la actividad de la fosfatasa; en cambio, lo contrario no pudo demostrarse, o sea, la inhibición de la enzima estaba siempre asociada a la inhibición de la incorporación de fosfato.

Estos resultados coinciden con los obtenidos más tarde por Buetow y Schmit (1968), quienes demostraron que el crecimiento de Euglena gracilis blanqueada con estreptomicina depende, por lo menos en parte, de la disponibilidad de fósforo.

Así, a bajas concentraciones del mismo, Euglena aparentemente agota al medio de este elemento esencial, y en consecuencia su desarrollo se encuentra muy limitado. Además, ya había sido demostrado que Euglena, junto con otros flagelados, tiene la capacidad de concentrar fósforo.

Así, células transferidas de un medio conteniendo fósforo a uno deficiente en este componente, son capaces de sobrevivir, por lo menos 6-7 días. Esta supervivencia puede ser atribuída quizás, a esta habilidad de concentrar fósforo, que luego podría ser empleado en condiciones deprivativas del mismo.

Estos autores también encontraron que células blanqueadas de E. gracilis son capaces de inducir una fosfatasa ácida no-específica en estas condiciones, lo cual permitiría obtener fósforo a partir de la hidrólisis de compuestos orgánicos de fosfato intra y extracelulares. La capacidad inducida de acumular fosfato rápidamente, incorporándolo del medio de cultivo, cuando se repone en el mismo la fuente de fosfato inorgánico, que había sido demostrada por Blum (1966), es confirmada en este trabajo de Buetow y Schmit (1968) quienes encontraron, en esas condiciones, tiempos de generación muy rápidos luego de un período lag.

Concentraciones elevadas de fósforo (mayores de 1 ugr/ml) inhiben el crecimiento en términos de densidad celular por ml y tiempos de generación, desconociéndose aún el mecanismo de producción de este fenómeno.

La mayor parte de ^{32}P inorgánico es incorporada en la fracción de ácidos nucleicos (soluble en TCA caliente) y en lípidos y lipoproteínas (fracción soluble en etano-éter). La proteína residual contiene sólo una pequeña fracción de ^{32}P total, como ocurre en células verdes; además como sólo una pequeña cantidad de ^{32}P fue encontrado en el DNA, la mayoría de la marca de la fracción de ácidos nucleicos corresponde al RNA.

g) CO_2: algunas especies de Euglena pueden fijar heterotróficamente CO_2, siendo éste otro de sus requerimientos, que favorece la división celular.

Así, la E. gracilis Z crecida con glucosa o acetato permanece en fase logarítmica por un período de tiempo mucho más prolongado cuando se enriquece el aire con 5% de CO_2 (Heinrich, 1966); parte de este efecto es debido, sin duda, a la acción buffer del CO_2. También influye la fuente de carbono empleada; por ejemplo, cultivos heterotróficos de E. gracilis crecidos con glucosa fijan CO_2, aproximadamente 2 veces más rápidamente que células crecidas con acetato como fuente de carbono.

Además se observan diferencias cualitativas en los primeros productos de la fijación heterotrófica de CO_2, según las células crezcan en un medio que

contenga una u otra fuente de carbono. Si ésta es acetato, la fijación del CO_2 es menos importante como medio de regeneración de los intermediarios de Krebs convertidos en aminoácidos, etc., puesto que por el by-pass del glioxalato (que es inducido por acetato) se llega al mismo resultado.

h) Oxígeno: los requerimientos de oxígeno para el crecimiento óptimo de Euglena dependen de la fuente de carbono empleada en el medio de cultivo. Así, si las células se hacen crecer en presencia de acetato ó etanol consumen de 3 a 5 veces más oxígeno durante el crecimiento logarítimico, que si se emplea glucosa como fuente de carbono, a pesar que ésta sostiene la misma velocidad de crecimiento y las células tienen, esencialmente, el mismo perfil bioquímico.

i) Otros requerimientos inorgánicos: Euglena gracilis tiene además requerimientos de trazas de otros nutrientes inorgánicos, no habiéndose realizado aún un estudio sistemático de sus niveles mínimos.

Mientras que algunos medios requieren la adición de cobre, molibdato, manganeso, boro, etc.; en otros no es necesario agregarlos ya que el requerimiento de estos elementos ya se encuentra cubierto por las trazas contaminantes de los mismos en otras sales.

III.4.2.- Vitamínicos

III.4.2.1. Vitamina B_1: la tiamina, la cual interviene en la decarboxilación de los -cetoácidos como pirofosfato de tiamina, no es un requerimiento para todas las especies de Euglena.

Cramer y Myers encontraron (1952) que la vitamina B_1 era necesaria para el crecimiento de E. gracilis var. bacillaris y para la cepa E. vischer; confirmando así los resultados de Hutner et al (1949); fracasando además, en todos sus intentos de reemplazarla por distintos aminoácidos y ácidos orgánicos.

III.4.2.2. Vitamina B_{12}: este compuesto es un requerimiento esencial para el crecimiento de varios microorganismos, incluyendo Euglena gracilis Z, siendo esta cepa precisamente la mś sensible a su deficiencia (Figura 54).

La vitamina B_{12} ó cianocobalamina, agregada al medio de cultivo, puede ser autoclavada a 120°C, con la pérdida de sólo un 1-2% de actividad.

La forma de coenzima (5'-deoxiadenosilcobalamina), que es la funcional en muchas de las reacciones mediadas por la vitamina B_{12}, es extremadamente sensible a la luz; también la cianocobalamina es sensible a la luz ya que ésta libera cianuro dejando hidroxicobalamina, efecto que se revierte en la oscuridad; una exposición prolongada, no obstante, produce un daño irreversible.

Varios análogos de la Vit. B_{12} pueden reemplazarla siendo capaces de mantener el crecimiento de Euglena; esta pérdida de especificidad parecería indicar que no todas las enzimas requeridas para su síntesis faltan en este microorganismo

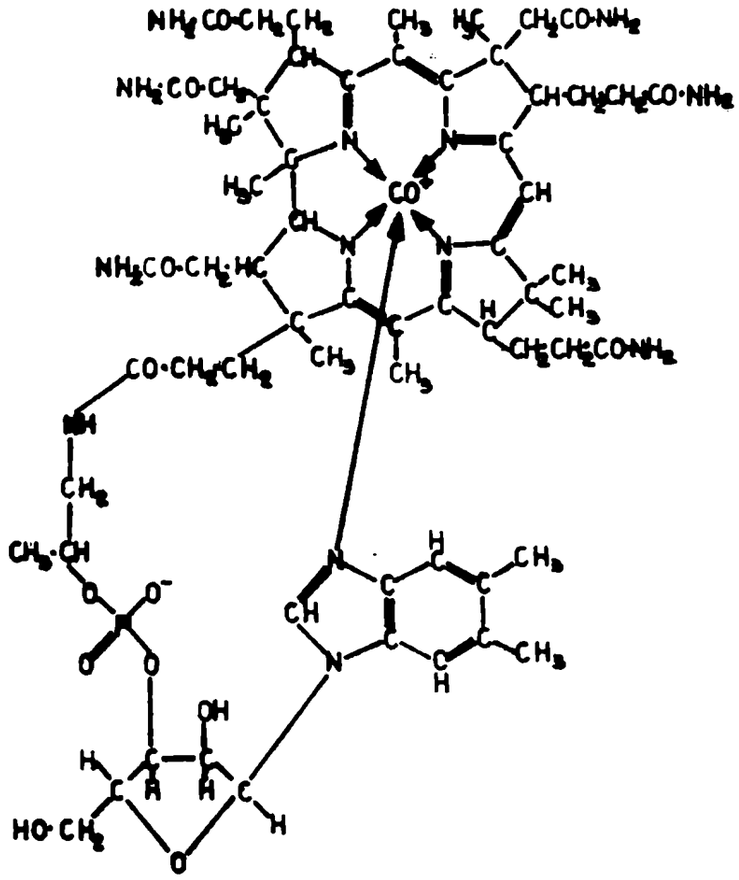


Figura 54 : Vitamina B_{12}

Muto (1957) demostró que homogenatos de Euglena pueden sintetizar B_{12} a partir de una cobalto-porfirina y 5,6-dimetilbenzimidazol.

Sin embargo, Nathan y Funk (1962) encontraron que el factor "B" (B_{12} sin el nucleótido) más benzimidazol ó 5-metilbienzimidazol no podían reemplazar a la Vit. B_{12} en mantener el crecimiento de Euglena.

Epstein et al (1962) estudiando el efecto de diferentes concentraciones de B_{12} sobre el tamaño y crecimiento de Euglena gracilis demostraron que la velocidad de crecimiento celular era directamente proporcional a la concentración de la vitamina mientras que el tamaño celular estaba inversamente relacionado con la misma.

Así, una severa deficiencia de B_{12} daba como resultado la formación de células gigantes y tiempos de generación prolongados, o sea, la velocidad de multiplicación se encontraba disminuída. Sugirieron que, a semejanza con lo que ocurría con E. coli, estos efectos eran el resultado de una continua síntesis de RNA y proteínas sin una concomitante replicación celular y mitosis.

Las propiedades estimulantes que tiene la vitamina B_{12} sobre el crecimiento de Euglena, harían pensar que los antagonistas "anti-B_{12}" podrían inhibirla. Epstein y Timmis (1963) estudiaron aproximadamente 300 de estos compuestos y encontraron ejemplos de antagonismo competitivo de B_{12} entre estructuras variadas, incluyendo purinas, pteridinas y nicotinamida, a pesar que ninguna de ellas tenía una buena analogía estructural con la cianocobalamina.

Si bien Euglena puede crecer bien en presencia de una amplia variedad de derivados por sustitución de la B_{12}, los que difieren en la parte benzoimidazólica de la molécula, los benzoimidazoles de por sí, son tóxicos (Epstein, 1960; Funk y Nathan, 1958).

En 1955, Soldo encontró que a concentraciones suóptimas de B_{12} las células de Euglena presentan niveles reducidos de RNA y DNA, sin observarse aparentemente una acumulación de paramilón ó carotenoides, comparadas con las células normales.

Posteriormente, en 1965, Vemkataraman et al, estudiaron el rol de la vitamina B_{12} en el metabolismo de Euglena gracilis. Los resultados obtenidos indicaron que: i) concentraciones subóptimas de la vitamina en el medio de cultivo producían células con bajos niveles de RNA, DNA y proteínas;

ii) la adición de vitamina B_{12} a células deficientes estimula la incorporación de (^{14}C) formiato en los componentes celulares nombrados en i), como así también en la timina del DNA y serina y metionina de las proteínas;

iii) en un sistema libre de células (deficientes en B_{12}), la incorporación de formiato marcado en timidilato se encuentra disminuída en mayor grado si se emplea uridina en lugar de deoxiuridina como sustrato;

iv) el agregado de glutamato frío diluye la radioactividad incorporada en la timina a partir de formiato marcado. Estos resultados fueron interpretados por los autores como una demostración de que, en la síntesis de DNA, la vitamina B_{12} cumple un rol más importante en la reducción de ribótidos a deoxiribótidos que en la reducción de formiato a metil-timina; y que la conversión de glutamato en β-metilaspartato dependiente de B_{12} también contribuye a la síntesis de timina.

Carell (1969) estudió los efectos de la deficiencia de B_{12} sobre la replicación y desarrollo de los cloroplastos; demostró que cuando E. gracilis Z crece en un medio deficiente en B_{12}, la cantidad de proteína y de clorofila por célula, aumenta a medida que disminuye la concentración de B_{12} en el medio y consecuentemente en la célula. El aumento en proteínas celulares es proporcional al incremento en el número de cloroplastos por célula, al cual precede. Sin embargo esta replicación de los cloroplastos bajo condiciones de deficiencia de B_{12} no está acompañada de una división celular ó nuclear.

Carell (1969) concluye, por lo tanto, que la replicación de los cloroplastos de E. gracilis es un hecho independiente de la replicación celular y nuclear, por lo menos en estas condiciones experimentales.

Años más tarde, Bré y Lefort-Tran (1974) estudiaron también la influencia de la deficiencia de B_{12} sobre el desarrollo de los cloroplastos de E. gracilis Z, crecida en medio lactato y llegaron a resultados que difieren ligeramente de los obtenidos por Carell (1968). Encontraron que la carencia de vitamina B_{12} inducía un aumento del tamaño celular, del número de mitocondrias y del de cloroplastos, que parecían organizarse en forma de una red. Estos resultados coinciden con los hallados en trabajos anteriores; la discrepancia con éstos reside en la observación de que la evolución de la relación proteínas cloroplásticas/proteínas celulares permite pensar que, a pesar del cese de las divisiones, el control nuclear continúa ejerciéndose sobre la evolución de la masa cloroplástica en carencia de B_{12}.

En un trabajo reciente Sherata y Kempner (1978), analizaron la distribución de los cambios sequenciales en el volumen celular de Euglena gracilis durante la privación de vitamina B_{12}.

Observaron que durante la privación de B_{12} había un aumento muy significativo en la forma promedio de las células y una formación progresiva de dos clases de formas celulares. Aproximadamente a las 100 horas de privación, se había comenzado a desarrollar un segundo tipo más grande de células, mientras que el número de células continuaba aún en aumento. Esta distribución bimodal es típica de los últimos estadíos en un ayuno de B_{12}.

Normalmente, los cambios en el volumen celular durante el ciclo de vida de Euglena, está correlacionado con el crecimiento y la edad del cultivo. Además el crecimiento de toda la población involucra un aumento en el número y tamaño de las células individualmente.

En el caso de un crecimiento balanceado, la distribución de formas celulares (y por lo tanto la media) permanece constante, así el crecimiento es proporcional a la velocidad de aumento en el número de células. Cuando se perturba este estado estacionario, se debe tener en consideración el cambio en el volumen celular medio.

En un cultivo deficiente en B_{12}, el aumento en el volumen total de material celular, el cual indica la capacidad sintética total de las células, es mucho mayor que la velocidad con la cual aumenta el número de células.

Resultó interesante comparar este caso con la privación de ácido glutámico en E. gracilis, en el cual el análisis de la distribución del volumen celular indica que todas las células, independientemente de la edad, sufren una disminución proporcional del volumen. Estos resultados fueron obtenidos bajo condiciones en las cuales el ácido glutámico era la única fuente de carbono, nitrógeno y energía. Por lo tanto, como en este caso hay una privación generalizada, el resultado es un efecto generalizado sobre todos los caminos biosintéticos, lo cual es muy distinto a la acción específica de un micronutriente, como lo es la vitamina B_{12}.

En este caso, la aparición de dos tipos de células en cuanto a forma y tamaño, es consistente con el hecho de que el crecimiento de una subpoblación, o sea una parte de la población de células, está inhibida en un punto único de su ciclo de vida.

Las células restantes están también inhibidas, pero no en un locus específico, identificable por los métodos empleados.

Evidentemente existe una inhibición parcial en un paso previo a la división; por lo tanto tendría que estar bloqueada la síntesis de DNA, pues de otra forma, se formarían células binucleadas. Estos autores no encontraron en sus cultivos más de un 1% de células binucleadas; o sea que a pesar que la nueva población de células comprende aproximadamente 1/3 de la población total, no existe acumulación de células binucleadas; por lo tanto es imposible que la división celular en sí esté bloqueada.

La inhibición diferencial de la síntesis de DNA apoya la hipótesis de que la vitamina B_{12} está involucrada en uno de los últimos pasos de la replicación del DNA; lo cual eventualmente inhibe la división. Por lo tanto, los autores, concluyen que la privación de una población de E. gracilis; en algunas hay una inhibición del crecimiento en un único punto en el ciclo celular, y esta interferencia está cinéticamente localizada entre la iniciación de la síntesis de DNA y la división nuclear.

El mecanismo de inhibición en las otras células es diferente y aún desconocido.

III.4.2.1. Euglena gracilis y su empleo en el dosaje de B_{12} sérica.

Debido al requerimiento esencial de vitamina B_{12} para el crecimiento de E. gracilis y a las propiedades estimulantes que tiene sobre el mismo, este microorganismo se lo emplea, desde hace ya varios años, para dosar la concentración de esta vitamina en suero.

A pesar que Euglena crece más lentamente que las bacterias (que también la necesitan), la primera tiene la ventaja de una mayor sensibilidad. De todas las cepas de Euglena gracilis la más apropiada es E. gracilis Z, debido precisamente a que como se enfatizó es la más sensible a la deficiencia de B_{12}.

El ensayo original (Hutner et al, 1949) ha sido posteriormente modificado varias veces y hoy en día se suele reemplazar por técnicas más precisas y sensibles, como ser métodos radioactivos.

Los resultados del ensayo empleando E. gracilis pueden verse afectados por agentes antimicrobianos presentes en el suero (Lie et al, 1969). Por ejemplo, las sulfonamidas (como veremos más adelante) inhiben el crecimiento de Euglena, en concentraciones accesibles en el suero durante el tratamiento. La estreptomicina, clortetraciclina, eritromicina, kanamicina y los nitrofuranos son agentes blanqueantes de Euglena, pero, para ello se requieren concentraciones mayores que las correspondientes al pico normal de los niveles sanguíneos terapéuticos.

Por supuesto, estas sustancias que perturban el crecimiento de E. gracilis, inhibitorias y/o blanqueantes, darán por supuesto resultados falsos, más bajos de vitamina B_{12} sérica. Se pueden evitar estos errores comprobando o no la presencia de estas sustancias, por microscopía de los cultivos en ensayo y recuento del número de células de Euglena (Lie et al, 1969).

Adams et al (1971) reportaron que la cuantificación de sueros ó soluciones que contengan coenzima B_{12} ó metilcobalamina, empleando como standards cianocobalamina o hidroxicobalamina, dará resultados más bajos que los correspondientes, debido a que los primeros son menos efectivas en promover el crecimiento de E. gracilis. La sulfitocobalamina es tan efectiva como la cianocobalamina e hidroxicobalamina; pero la nitrocobalamina es menos efectiva.

El factor "B", los ácidos monocarboxílicos de ciano e hidroxicobalamina y los ácidos dicarboxílicos de la cianocobalamina son inactivos en promover el crecimiento de E. gracilis.

En otro estudio Benson (1972) reportó que los valores de B_{12} obtenidos empleando E. gracilis pueden ser erróneamente más altos ó más bajos que los correspondientes debidos a los iones presentes en los buffers empleados en la cromatografía de las distintas fracciones séricas. El motivo de este error se basa en el hecho de que el crecimiento de E. gracilis es mayor cuando el medio contiene determinada concentración de sales, pero concentraciones elevadas lo inhiben totalmente.

III.4.3.- Fuentes exógenas de Carbono

Aún entre las diferentes cepas de E. gracilis existen amplias diferencias en su capacidad para utilizar las distintas fuentes exógenas de Carbono para su crecimiento.

Algunas son totótrofas obligadas, mientras que otras pueden crecer en la oscuridad sólo en presencia de un restrictivo número de fuentes de carbono; además varios euglenoides flagelados pueden crecer perfectamente bien, heterotróficamente empleando una amplia variedad de fuentes de carbono.

Algunas cepas, por ejemplo, no pueden crecer en un medio que contenga glucosa como fuente de carbono, lo cual se debe a la ausencia de hexoquinasa; enzima que se encuentra frecuentemente en las cepas fuertemente heterotróficas.

E. gracilis Z que exhibe un fuerte crecimiento heterotrófico, puede utilizar una gran variedad de fuentes exógenas de carbono como ser: glucosa, fructosa, piruvato, succinato fumarato, malato, etanol, propanol, butanol, acetato, butirato y glutamato.

III.5.- INFLUENCIA DE EUGLENA SOBRE EL MEDIO AMBIENTE

III.5.1.- Cambios en el pH

A medida que Euglena va utilizando los diferentes componentes del medio de cultivo, requeridos para su crecimiento, el pH del medio se va modificando, pudiendo llegar a un valor tal que inhibe al crecimiento. Por ejemplo, se hace crecer E. gracilis Z heterotróficamente en un medio con un pH inicial = 5.5, conteniendo glucosa como única fuente de carbono y $(NH_4)_2HPO_4$ y KH_2PO_4 como buffers, además de emplearse el primero como fuente de nitrógeno. El pH final resultante será igual o menor que 3 debido a la remoción del NH_4^+. En cambio si al mismo medio se le agrega acetato en lugar de glucosa como fuente de carbono, el pH aumentará ligeramente a medida que las células crecen puesto que ahora la remoción del amonio está comp-nsada por la del acetato.

Euglena gracilis crece muy poco en medios alcalinos, siendo más apropiados los medios neutros o ligeramente ácidos; por lo tanto si se emplea acetato de sodio como fuente de carbono, se deben tomar las precauciones adecuadas como para mantener el pH del medio en el valor apropiado.

III.5.2.- Agotamiento de nutrientes

En general, la velocidad a la cual los nutrientes son consumidos será proporcional a la velocidad de incremento de la masa celular.

Por otro lado, resulta difícil determinar cuál es el nutriente que se hace limitante cuando el cultivo entre en fase estacionaria; asumiendo que ésta no es el resultado de algún otro efecto, como ser cambios del pH del medio.

Tampoco puede descartarse la posibilidad de que haya uno o más productos que inhiben el crecimiento o la división celular que puedan ser excretados al medio.

III.6.- EFECTOS DEL MEDIO AMBIENTE SOBRE EUGLENA

Se han estudiado los efectos de ciertas variables ambientales, fácilmente controlables, las cuales afectan directamente el crecimiento y la fisiología de Euglena.

Entre ellas citaremos:

III.6.1. pH inicial del medio de cultivo

Dentro de ciertos límites, Euglena crece mejor en medios ácidos, como ya se mencionó antes, aunque el rango de valores de pH's que permiten un crecimiento óptimo depende, en gran parte, de la composición del medio y de la fuente exógena de carbono empleada.

Además el pH que permite un óptimo consumo de O_2 no siempre coincide con el que promueve un crecimiento óptimo; así en algunos casos, la respiración procede vigorosamente a una acidez que no permite el crecimiento; mientras que en otros casos la respiración (por encima de la endógena) es despreciable a valores de pH óptimos para la velocidad de crecimiento. Cook y Heinrich (1965) compararon el efecto del pH_i del medio de cultivo, sobre el crecimiento de E. gracilis Z, empleando acetato o glucosa como única fuente de carbono. El pH óptimo para el crecimiento con glucosa era de 3 a 4, mientras que el tiempo de generación aumentaba significativamente por encima de pH = 7.

Encontraron, por otro lado, pequeñas variaciones en el tiempo de generación cuando emplearon acetato como fuente de carbono, con valores iniciales de pH entre 6 y 9; no obstante la densidad máxima alcanzada era mucho menor cuando el pH_i era superior a 7. Además ésta disminuía al aumentar el pH_i en los cultivos de Euglena, lo cual lo adjudicaron al posterior aumento del pH durante el crecimiento como resultado del consumo de acetato.

El crecimiento con etanol como fuente de carbono, produce un cultivo más denso que el obtenido empleando acetato y las células que lo componen presentan esencialmente el mismo perfil bioquímico y fisiológico (Buetow y Padilla, 1963).

Es posible obtener cultivos relativamente densos con acetato si se parte del valor de pH más bajo posible (5.1 - 5.3) y si se lo airea, especialmente con aire enriquecido con un 5% de CO_2, cuyo efecto buffer disminuye la velocidad de cambio del pH del medio.

III.6.2. Fuente exógena de carbono

La fuente exógena de carbono en el medio de cultivo tiene una marcada influencia sobre el crecimiento, la fisiología respiratoria y el metabolismo de Euglena gracilis. Levedahl y Wilsar (1966) analizaron la habilidad de Euglena gracilis para formar la masa celular a partir de diferentes fuentes de carbono a bajas concentraciones.

Reportaron que cuando las células se hacían crecer en presencia de succinato, acetato o etanol (como fuentes de carbono), la población celular final era proporcional a la concentración inicial de la fuente de carbono, desde 1.0 a 5.0 mM, a 24.4°C, como sería de esperar si el crecimiento estuviese limitado por la concentración de la fuente de carbono.

En base al peso seco del material formado, el etanol era el sustrato más efectivo para el crecimiento; el acetato era la mitad y el succinato aproximadamente un tercio con respecto al etanol.

Las velocidades de división de Euglena, sin embargo no variaban del mismo modo que la producción del peso seco según la fuente de carbono empleada.

La velocidad de incremento del número de células era mayor con acetato que con etanol o succinato; sin embargo, esas células respiraban más rápidamente con etanol y menos rápidamente en presencia de succinato; o sea el mismo orden observado para el crecimiento (producción de masa seca).

La máxima densidad de población obtenida por umol de fuente de carbono agregada dependía del pH del medio, para acetato y succinato, siendo mayor el número de células en medios ácidos que en neutros, como ya se explicó antes. En cambio, el número de células por umol de etanol era relativamente independiente del pH, en el rango estudiado.

La fuente de carbono agregada al medio de cultivo tiene un efecto significativo sobre la fisiología respiratoria de Euglena gracilis. Así, los compuestos con dos átomos de carbono, como acetato y etanol, dan como resultado niveles muy elevados de consumo de oxígeno, mientras que los intermediarios del ciclo de Krebs (Danforth, 1953) producen una estimulación despreciable de la respiración, aunque pueden sustentar velocidades de crecimiento aproximadamente iguales. Danforth (1958) también demostró que compuestos tales como propionato, butirato, lactato y piruvato estimulan el consumo de oxígeno a valores intermedios.

Cook y Heinrich (1965) reportaron que existen diferencias importantes entre células crecidas con glucosa y células crecidas con acetato como fuentes de carbono y energía, fundamentalmente estas diferencias se encuentran en su fisiología, actividad respiratoria, densidad máxima de población y contenido en RNA. Trabajando con Euglena gracilis Z crecida a la oscuridad, encontraron que, en los rangos óptimos de pH y concentración de sustrato, tanto la glucosa como el acetato mantienen esencialmente las mismas velocidades de crecimiento en cuanto a masa total y síntesis de proteínas. La glucosa, no obstante, producía una densidad de población 10 veces mayor que el acetato; pero no estimulaba la respiración por encima de los niveles endógenos, mientras que el consumo de oxígeno con acetato como fuente de carbono era 4 veces mayor que el endógeno. Además las células crecidas en presencia de acetato tenían un 50% más de RNA que las crecidas con glucosa.

Según Cook (1965) la respuesta respiratoria al acetato es "adaptativa" y en células crecidas previamente con una nutrición autotrófica, se requieren aproximadamente 5 generaciones para lograr una adaptación completa.

Esto se confirma con los resultados obtenidos por Cook y Heinrich (1965), quienes observaron que en células adaptadas a un crecimiento con glucosa, el etanol y acetato no tenían ya efecto sobre la respiración de la Euglena gracilis Z. Esta pérdida de la estimulación no era probablemente debida a un fenómeno de permeabilidad, puesto que el etanol y el acetato, por lo menos a los valores más bajos de pH, pueden penetrar libremente en la célula.

Según los autores se requiere un período de adaptación en presencia de acetato antes que la respiración de células adaptadas a crecer con glucosa sea estimulada por el acetato.

Es muy probable que la inducción de los sistemas enzimáticos que metabolizan el acetato esté relacionada con las cantidades masivas de RNA producidas en células crecidas con acetato comparadas con las células crecidas con glucosa.

También, probablemente las primeras retengan la mayoría de las enzimas involucradas en el empleo de la glucosa, ya que hay claras evidencias de que el sustrato empleado para la respiración endógena de Euglena crecida en presencia de acetato es el paramilón, un polisacárido de glucosa.

Podemos agregar un efecto adicional del acetato sobre la síntesis de clorofila, el cual fue estudiado por Buetow (1967) empleando células de Euglena gracilis Z. Observó que si se agrega al medio de cultivo un exceso de acetato, éste inhibía la síntesis de clorofila, y en menor grado el crecimiento, produciéndose concomitantemente un aumento en la síntesis de paramilón.

Este último efecto sería posiblemente adaptativo, coincidiendo con los resultados de Cook et al (1965), porque finalmente las células deben usar el material de reserva para la síntesis de cloroplastos y para el metabolismo basal cuando el acetato externo sea consumido. Esta interpretación se apoya en el hecho de que el carbono fijado en la fotosíntesis, en Euglenam es utilizado casi exclusivamente para la síntesis proteica, cuando está presente acetato en el medio de cultivo; mientras que el acetato incorporado a partir de éste se emplea fundamentalmente para síntesis de lípidos y polisacáridos.

Parecería, según el autor, que el acetato puede reprimir fuertemente ciertas enzimas involucradas en el proceso final de maduración de los cloroplastos, ya que ha sido demostrado que además de la glucosa, cualquier compuesto hidrocarbonado que puede ser usado eficientemente como fuente de metabolitos intermediarios y de energía por un microorganismo, puede reprimir ciertas enzimas inducibles.

La inhibición máxima de la síntesis de clorofila es de aproximadamente un 75%, para concentraciones iguales o mayores que 47.5 mmoles/l; por lo tanto esto parecería indicar la existencia de un mecanismo de control celular en Euglena gracilis, que debe prevenir de una represión total de la síntesis de clorofila, por el acetato.

Por otro lado el ciclo del glioxilato está íntimamente relacionado con la utilización de acetato o etanol en Euglena gracilis. Esta secuencia, en la cual el isocitrato se metaboliza a glioxilato y succinato, seguido por la condensación del glioxilato con acetil-CoA para dar malato, es anaeróbica.

Heinrich y Cook (1967) reportaron que el ciclo del glioxilato opera a un alto nivel en Euglena gracilis cuando el acetato es la única fuente de carbono y a un nivel bajo cuando la glucosa es empleada como única fuente de carbono, como se evidencia por las actividades de la enzima malato sintetasa.

A pesar de que la glucosa produce una represión moderada de algunas de las enzimas del ciclo del glioxilato, nunca reprime ni inhibe a la malato sintetasa; cuya actividad es 5 veces mayor en células crecidas con acetato que en aquellas crecidas con glucosa.

El acetato, por otro lado, no aumenta la actividad de la isocitrato dehidrogenasa (y presumiblemente de ninguna enzima del ciclo de los ácidos tricarboxílicos), se presenta una situación anómala en la cual la inducción de una serie de reacciones anaeróbicas por el glioxilato, da como resultado un aumento en la captación de O_2 por Euglena sin que se produzca un aumento concomitante en la actividad del ciclo de Krebs. Es de hacer notar que si bien la actividad de la malato dehidrogenasa, la isoenzima que requiere O_2 y que es común a ambos ciclos (TCA y glioxilato), es mayor en células crecidas en presencia de acetato que en presencia de glucosa (o crecida autotróficamente), la diferencia existente no alcanza para explicar el consumo total de O_2 por Euglena, crecida en presencia de acetato como única fuente de carbono.

Algunos autores han sugerido que el O_2 podría estar involucrado en ciertas reacciones (desconocidas) asociadas directamente con el by-pass del glioxilato cuando el medio contiene acetato, además de comportarse como aceptor de electrones en la cadena respiratoria (Cook y Harver, 1966; Heinrich y Cook, 1966).

Es de interés agregar que el propionato y el butirato, los cuales se pueden condensar con el glioxilato en forma semejante que el acetato (Robin et al 1965), también estimulan el consumo de O_2 en E. gracilis (Danforth, 1953).

III.6.3. Efectos de la luz

La velocidad de crecimiento de E. gracilis Z en cultivos estrictamente fototróficos, es óptima en el rango de 400-1200ft-c (Cook, 1963). Intensidades de luz menores que 400 ft-c, mantienen una velocidad de crecimiento reducida, mientras que intensidades del orden de 3000 ft-c son ligeramente inhibitorias.

El contenido de clorofila de las células, es inversamente proporcional a la intensidad de la luz; además curiosamente el volumen celular aumenta a bajas intensidades (65 ft-c), mientras que la masa celular disminuye. Estas adaptaciones a bajas intensidades luminosas, o sea aumento de la concentración de clorofila y del volumen celular el cual es el resultado de una dispersión de los

cloroplastos, tienen como fin aumentar la cantidad de luz que puede ser absorbida, permitiendo así velocidades óptimas de crecimiento a intensidades de luz reducidas. Sin embargo, si bien estas adaptaciones para aumentar la capacidad fotosintética, permiten una velocidad óptima de crecimiento, no son las apropiadas para mantener velocidades biosintéticas óptimas.

La masa celular disminuye a intensidades menores que 1200 ft-c en forma proporcional a la velocidad de fotosíntesis observada; en general las variaciones en el volúmen celular con la intensidad luminosa son debidas a grados variables de acumulación de paramilón; el contenido proteico y de RNA permanecen constantes, aún a bajas intensidades de luz (120 ft-c), mientras que los lípidos aumentan ligeramente, lo cual es debido a que la mayoría de ellos están asociados al aparato fotosintético.

En aquellas especies de E. gracilis que muestran un fuerte crecimiento heterotrófico, la presencia de acetato y luz dan como resultado modelos de fijación de CO_2 marcadamente alterados. Por ejemplo: en E. gracilis Z crecida en esas condiciones, más de un 90% del bicarbonato -^{14}C fijado se incorpora en la fracción proteica, mientras que en los cultivos estrictamente autótrofos la marca se encuentra distribuída casi equitativamente entre los lípidos y el paramilón (Cook, 1965).

Cuando las células crecen en presencia de luz, el acetato radioactivo se incorpora casi totalmente en los lípidos y en el paramilón y sólo un 6% de la marca se encuentra en las proteínas. En cambio, en cultivos estrictamente heterotróficos (utilización concomitante de la fotosíntesis y fuentes exógenas de carbono para el crecimiento) un 70% del acetato marcado es incorporado en las proteínas.

La luz también afecta la división celular de Euglena, que puede inhibirse por la luz visible (Cook, 1960). En cultivos autotróficos esta inhibición no es fácilmente detectable, pero puede llegar a ser muy severa en células etioladas expuestas a la luz. En estas células, con capacidad de enverdecimiento, la inhibición desaparece o se supera luego de unas pocas generaciones y este recuperación está asociada al aparato totosintético (Cook, 1966). Además, si el crecimiento no está limitado por algún nutriente, las células etioladas se recuperan más rápidamente que las blanqueadas permanentemente (Cook, 1960).

De acuerdo con los trabajos de varios autores, parecería que la luz destruye o previene la formación de algún intermediario necesario para la división de las células de E. gracilis. Este efecto es menos serio en células verdes, lo cual puede deberse o bien a una protección ejercida por los pigmentos o quizás porque los caminos biosintéticos afectados son menos importantes durante el crecimiento autotrófico.

Por supuesto, el efecto más importante de la luz sobre Euglena crecida en la oscuridad es la inducción de la síntesis de clorofila y el desarrollo del cloroplasto. Asociada e esta inducción se encuentra la síntesis de grandes cantidades de RNA y proteínas, destinadas casi totalmente a los plástidos (Brawerman et al, 1962).

Schiff (1973, 1974, 1975) y Bingham y Schiff (1976) han demostrado que cuando E. gracilis var. bacillaris se hace crecer continuamente a la luz, contiene alrededor de 10 cloroplastos, que se dividen de manera tal que se mantiene el número de plástidos relativamente constante, de una generación a la otra. Cuando se hace crecer en la oscuridad, los plástidos se convierten en proplástidos y también su número se conserva relativamente constante a medida que las células se dividen. Si las células crecidas en la oscuridad se colocan entonces en un medio en reposo, sin los nutrientes esenciales para el desarrollo, la división celular cesa, pero por exposición a la luz de estos cultivos, los proplástidos de estas células en reposo se convierten en verdaderos cloroplastos en el término de 72-96 horas constituyendo un sistema excelente para el estudio de los detalles íntimos que acompañan al proceso de desarrollo de los cloroplastos.

Por último, según Cook (1966 c), la luz también puede estimular la síntesis de DNA cloroplástico.

III.6.4. Efectos de la temperatura

Una de las propiedades que resulta afectada por la temperatura es la velocidad de división celular. Es importante aclarar que aquellas cepas de E. gracilis que tienen un fuerte crecimiento heterotrófico (E. gracilis Z) parecen tolerar mejor altas temperaturas (Baker et al, 1955), o sea correlacionada con la característica de "alta temperatura" estaría la habilidad para utilizar un amplio espectro de sustratos y una mayor tolerancia osmótica, en contraposición con las llamadas cepas de "baja temperatura".

Aún entre cepas muy relacionadas morfológica y fisiológicamente pertenecientes a la especie E. gracilis, existen diferencias cuantitativas en sus respuestas a la temperatura (Cook, 1966). Por ejemplo: si se comparan los tiempos de generación de Euglena gracilis Z, E. gracilis var. bacillaris y E. gracilis var. bacillaris SM-L1 crecidas heterotróficamente a diferentes temperaturas, se observa que, si bien las tres tienen aproximadamente la misma temperatura óptima de división celular (29-30°C), la var. bacillaris crece, más lentamente (o más tarde) a la temperatura de incubación que la cepa Z.

Altas temperaturas favorecen la división celular y bajas temperaturas favorecen el crecimiento protoplasmático de E. gracilis (Buetow, 1962).

En contraste con otros organismos, el consumo de O_2 por Euglena crecida en presencia de acetato, aumenta linealmente en lugar de hacerlo exponencialmente, a medida que se aumenta la temperatura (Buetow, 1963); el nivel de respiración endógena permanece prácticamente invariable. Por lo tanto, vemos que la temperatura puede distinguir entre el consumo endógeno de O_2 y el consumo de O_2 estimulado por acetato.

Se llaman temperaturas supraóptimas a aquellas mayores que la temperatura que permite una velocidad de división óptima; en E. gracilis temperaturas

más elevadas que 30°C son generalmente supraóptimas (Buetow, 1962; Cook, 1966 b) a pesar que algunas cepas de "bajas temperaturas" se multiplican en forma óptima a aproximadamente 25-26°C.

Mientras que las temperaturas supraóptimas retardan los procesos de división, no necesariamente reducen la capacidad de crecimiento protoplasmático, por lo menos hasta 36-37°C para E. gracilis Z. Este fenómeno es el que permite la sincronización de la división celular en Euglena, al cual ya nos hemos referido.

El efecto más importante producido por temperaturas supraóptimas es el blanqueamiento permanente de Euglena, existiendo diferencias entre las distintas cepas en su respuesta al mismo.

Las de "baja temperatura" son más resistentes y aún entre las cepas de "alta temperatura" se pueden encontrar algunas resistentes a la acción blanqueante de temperaturas elevadas.

Brawerman y Chargaff (1960) reportaron que en E. gracilis Z la pérdida de la capacidad para sintetizar clorofila, o sea el blanqueamiento por temperaturas elevadas, está íntimamente relacionado con la velocidad de multiplicación celular.

Gross y Jahn (1962) estudiaron los efectos morfológicos y fisiológicos producidos por Euglena por temperaturas elevadas y determinaron el rango de temperatura en el cual la luz ejerce su efecto inhibitorio. Trabajaron con cultivos de Euglena en un medio orgánico complejo, en oscuridad y a varias intensidades de luz (15, 60 y 150 ft-c) a temperaturas desde 20 a 35°C. Encontraron que por debajo de 32,5°C el crecimiento de Euglena era independiente de la luz; a 35°C éste era inversamente proporcional a la intensidad de la luz. Además a 35°C observaron en el cultivo la presencia de células grandes y multinucleadas, apareciendo el mayor porcentaje de células anormales a las intensidades de luz más elevadas, aunque también encontraron algunas en cultivos crecidos en ausencia de luz a 35°C.

Los resultados presentados por estos autores sugieren que el efecto de la luz sobre Euglena es de importancia secundaria ya que el crecimiento es inhibido a 35°C, independientemente de la intensidad de la luz; ésta sólo aumenta el efecto de la temperatura. Además a bajas temperaturas, el crecimiento de Euglena es independiente de la luz hasta una intensidad de 150 ft-c.

Para explicar la inhibición del crecimiento y la formación de células anormales, inducidas ambas por temperaturas elevadas en Euglena, los autores postularon que se producía la desnaturalización de una proteína termosensible y formada en ausencia de luz, la cual sería esencial para una división celular normal.

La luz por otro lado, podría incrementar el efecto del calor sobre la clorofila y los cloroplastos, al ser posiblemente convertida en calor intraplastídico a través de los carotenoides de los plástidos, teniendo así un rol indirecto en el fenómeno.

IV. ENZIMOLOGIA DE LA EUGLENA

IV.1.-INTRODUCCION

Como ya hemos puntualizado anteriormente, son varias las razones por las cuales los investigadores han elegido a Euglena como el organismo experimental, más apropiado para estudiar fundamentalmente los metabolismos fotosintéticos y respiratorios; así es que, desde hace varios años, la mayoría de los estudios enzimáticos están dirigidos particularmente hacia aquellas enzimas que intervienen en los dos procesos mencionados.

Posteriormente han sido descriptas algunas propiedades de sistemas enzimáticos involucrados en la síntesis de proteínas y ácidos grasos.

Hace relativamente pocos años que el interés de los investigadores se han volcado hacia el estudio de las propiedades de aquellas enzimas presentes en Euglena, implicadas en la síntesis y catabolismo de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y sus respectivos componentes.

IV.2.-ENZIMAS DEL METABOLISMO RESPIRATORIO

Se incluyen dentro del mismo aquellas enzimas que catalizan la síntesis y ruptura de los hidratos de carbono; los ciclos de los ácidos tricarboxílicos (ATC) y del glioxilato; y las reacciones respiratorias de transferencia de electrones

Han sido caracterizadas, por ejemplo, la mayoría de las enzimas que catalizan la síntesis y degradación del principal carbohidrato de reserva, paramilón, cuya estructura química es la correspondiente a un β-1,3-glucano. Entre ellas se encuentran: Uridina - di fosfato glucosa - β- 1,3 - glucan β - 3 - glucosil transferasa o también llamada Paramilón Sintetasa o β - 1,3 - glucano sintetasa, que cataliza la síntesis del β - 1,3 - glucano a partir de UPD glucosa, que fue aislada a partir de Euglena por Marechal y Goldemberg (1964).

Generalmente las enzimas que catalizan la síntesis de polisacáridos de reserva, tales como almidón y glocógeno, son insolubles y están unidas a membranas asociadas con el mismo polisacárido; sin embargo, la paramilón sintetasa de Euglena no parece estar asociada con los gránulos de paramilón.

Otra propiedad poco común de esta enzima es la falta del requerimiento de un "primer" para ejercer su acción, como ocurre en plantas superiores en las cuales la actividad de estas enzimas requiere la presencia de D-glucosa o ciertos D-glucósidos como "primer".

Las células que acumulan grandes cantidades de paramilón presentan, paralelamente, una elevada actividad de la sintetasa; además el contenido de paramilón de las células crecidas a la luz es menor que el de células en oscuridad, presentando las primeras una actividad disminuída de esta enzima.

Algunos autores suponen, sin embargo, que esta diferencia puede deberse en parte, a la existencia de un inhibidor de la enzima en las células verdes.

También ha sido detectado, aunque no completamente caracterizado ni estudiado, un sistema que libera glucosa a partir del β - 1,3 - glocano (Fellig, 1960; Tocher, 1962; Meeuse, 1964), una β - 1,3 - glucano hidrolasa, cuya función sería posiblemente la utilización del carbohidrato de reserva.

En un trabajo posterior, Vogel y Barber (1968) purificaron a partir de la fracción soluble de Eugena gracilis una enzima que era capaz de degradar este polisacárido a simples residuos de glucosa; siempre y cuando se rompieran primero los gránulos de paramilón con base diluída. Llamaron a esta enzima - 1,3 - Glucanasa, la cual estaba fuertemente unida al sustrato (paramilón) liberado por la hidrólisis básica, aunque no a los gránulos intactos. Su función se ve confirmada por el hecho de que su actividad específica se duplica cuando los cultivos celulares llegan a la fase estacionaria, o sea, la fase en la cual comienza la utilización del carbohidrato.

Otras enzimas cuya presencia se ha demostrado en Euglena son β - 1,3 - Oligoglucan Ortofosfatoglucosil transferasa (o Laminari - biosa- fosforilasa) que cataliza la reacción entre laminaribiosa (3-O - β - D - glucopiranosil - D - glucosa) más ortofosfato a glucosa 1 - P más glucosa; fue purificada por Goldemberg et al, (1966) a partir de extractos libres de células de Euglena gracilis; la UDP glucosa pirofosforilasa y la Fosfoglucomutasa involucradas en la interconvefsión del β - 1,3 - glucano y glucosa - 6 - P. En extractos de Euglena gracilis se ha confirmado también la existencia de todas las enzimas del camino glicolítico o de Embden - Meyerhoff - Parnas : 1) hexoquinasa, cuya función es la fosforilación de glucosa exógena o de la que proviene de la hidrólisis del glucano de reserva (Belsky y Schultz, 1962; Hurlbert y Rittenberg, 1962); no está asociada a mitocondrías a diferencia de lo que sucede con las enzimas de plantas superiores (Saltman, 1953); 2) Fructosa - 1-6 difosfato aldolasa, llamadas I y II (Rutter 1964) debido a las diferencias que presentan en sus características moleculares, propiedades y mecanismos catalíticos. De acuerdo a la variación de sus respectivos niveles como respuesta al crecimiento bajo distintas condiciones ambientales, se postuló que la I estaría primariamente involucrada en la fotosíntesis mientras que la II sería fundamentalmente en la glicólisis y en la glucogénesis.

Los experimentos de Price (1962 a) demostraron la presencia de dos Lactato dehidrogenasas, dependientes de NAD^+, una soluble y otra particulada, encontrándose la actividad de esta última significativamente disminuída en condiciones de deficiencia de Zn, mientras que la actividad de la forma soluble de la enzima no resulte alterada.

Están presentes asimismo en E.gracilis todas las enzimas pertenecientes al camino oxidativo de las pentosas; una fructosa- 1,6- difosfatasa neutra

que interviene en la gluconeogénesis, o sea la conversión de acetato exógeno a glucosa demostrado por Marzullo y Danforth (1964) y las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Buetow y Buchanan (1965) encontraron que estas fracciones mitocondriales de Euglena pueden llevar a cabo la fosforilación del ADP, acoplada a la oxidación de los intermediarios del A.T.C.-

Como ocurre en varios microorganismos capaces de crecer con acetato como única fuente de carbono, también en Euglena el ciclo del glioxilato provee una vía para la asimilación neta del acetato, (Danforth, 1961).

Se ha demostrado en este organismo la presencia de dos importantes enzimas de este camino metabólico: la isocitrato liasa y la malato sintetasa. El crecimiento con acetato no es un requerimiento esencial para la producción de la isocitrato liasa puesto que es sintetizada también por células crecidas con etanol (Haigh y Beevers, 1964) y está ausente en células crecidas autotróficamente. Las demás enzimas del ciclo del glioxilato son comunes al ciclo de los ATC, al cual ya nos hemos referido; de ellas la acetato tioquinasa ha sido estudiada exhaustivamente y fue purificada a partir de E.gracilis Z por Abraham y Bachhawat (1962). Estos mismos autores observaron que la actividad específica de la acetato tioquinasa aumentaba durante la fase logarítmica de cultivos crecidos en presencia de acetato.

Ohmam (1964) también hallo que en células crecidas heterotróficamente la actividad específica de esta enzima era de 6 a 10 veces mayor que la encontrada en extractos de células crecidas autotróficamente.

Por último, señalaremos que Buetow y Buchanan (1965) encontraron que fracciones particuladas, conteniendo mitocondrias de Euglena eran capaces de llevar a cabo la fosforilación oxidativa y que contenían $NADP^+$ - diagorasa, succinato dehidrogenasa y citocromos de tipo c y a (Perini et al, 1964 a, b).

En ciertas características este camino de transferencia de electrones de Euglena parecía diferir de los encontrados en levadura y mitocondrias de músculo cardiaco. El cianuro (1mM) inhibía la respiración de Euglena pero el CO a concentraciones elevadas (95%) tenía sólo un efecto marginal (Perini et al, 1964 b).

Gross y Wolkenv (1960) detectaron por primera vez, la presencia de un citocromo con una banda máxima de absorción a 556 mu, en extractos de Euglena crecida en oscuridad. Posteriormente Perini et al (1964 a) lo purificaron, señalando que si bien la banda estaba centrada a 556 m, el pico era asimétrico, con un máximo a 558 m y un hombro a 554,5 m. Este citocromo tipo c no participa en el proceso fotosintético, estando realmente asociado con el mecanismo respiratorio. La adición de acetato o succinato a una suspensión de células provoca una reducción espectroscópicamente medible del citocromo 556, la cual puede revertirse aireando la suspensión.

Como ya se ha mencionado, Euglena contiene otro citocromo respiratorio

autooxidable, tipo a, con un máximo de absorción en su forma reducida a 605 m (banda) y a 442-444 m (banda). Es reducido in vivo por succinato y este efecto es eliminado por cianuro 0,5 mM.

IV.3.-ENZIMAS Y COMPONENTES DE LA FOTOSINTESIS

La fijación fotosintética de CO_2 en Euglena parece ser el proceso típico semejante al encontrado en otros microorganismos (como Chlorella) y en varias plantas superiores, como lo indicó el modelo de compuestos marcados formados cuando se administró $^{14}CO_2$ a células de Euglena fotosintetizantes (Lynch y Calvin, 1953; Norris et al, 1955). Por lo tanto, todas las enzimas del ciclo reductivo del carbono fotosintético o ciclo de Calvin, han sido halladas en células verdes de Euglena gracilis.

Varias de estas enzimas, tal como la aldolasa, son comunes a ambos caminos metabólicos: el reductivo fotosintético y el oxidativo respiratorio, pero debe aclararse que a pesar de ello ambas enzimas no son necesariamente idénticas.

Así, si bien el contenido del aldolasa de células autotróficas y heterotróficas es comparable, los estudios acerca de su distribución intracelular han revelado que la transformación de heterotrofía a autotrofía está acompañada de un marcado incremento de la aldolasa cloroplástica y un detrimento de su contenido en la fracción no-plastídica, (Smillie, 1963). Una posibilidad para explicar estos resultados sería que la enzima citoplasmática penetre en los cloroplastos por algún mecanismo o alternativamente podría ser inactivada o degradada con una concomitante síntesis de una nueva aldolasa cloroplástica. Como ya se ha mencionado, según los trabajos de Rutter (1964) existen dos aldolasas (I y II) y por lo tanto la segunda posibilidad sería la más probable.

En organismos eucarióticos como E.gracilis, varias de las enzimas pertenecientes al ciclo de Calvin parecerían estar funcionalmente restringidas a los cloroplastos. Entre ellas han sido estudiadas las siguientes:

i) D-ribulosa-5-fosfato-quinasa, enzima que cataliza la fosforilación de la D-ribulosa-5-fosfato;

ii) D-ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa o carboxidismutasa, enzima que carboxila la D-ribulosa 1,5-difosfato dando como producto 2,3-fosfoglicerato. Ha sido detectada en extractos de Euglena crecida autotróficamente (Fuller y Gibbs, 1959; Peterkofsky y Rocker, 1961; Smillie, 1963; Lord et al, 1975).

Células heterotróficas crecidas en la oscuridad contienen sólo trazas de carboxidismutasa (Fuller y Gibbs, 1959).

Se la ha identificado frecuentemente con la principal fracción proteica soluble de los cloroplastos conocida como fracción I (Trown, 1965) y la misma fracción proteica ha sido identificada en extractos de células autotróficas y heterotróficas de Euglena (Andersen, 1967) por ultracentrifugación y electro

foresis en gel de poliacrilamida;

iii) NADP -gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa, enzima que cataliza la reacción entre el D-gliceraldehído 3-fosfato y ortofosfato, en presencia de $NADP^+$ para dar 1,3-difosfoglicerato y NADPH; parece que es la que es funcionalmente activa en el ciclo de Calvin (Gibbs, 1952; Annon, 1952). Esta enzima puede estar ausente o bien presente sólo en trazas en Euglena adaptada a la oscuridad y en mutantes blanqueadas con estreptomicina (Fuller y Gibbs, 1959), pero su síntesis es rápidamente inducida cuando las células etioladas se exponen a la luz.

A pesar que los autores coinciden en que la enzima dependiente de $NADP^+$ es activa en la fotosíntesis, no se puede aún asegurar que la dependencia de NAD^+ no sea funcional en la fijación fotosintética del CO_2. En efecto, en extractos preparados a partir de células autótrofas de Euglena, la enzima ligada a NAD^+ es la más activa de las dos.

iv) fructosa 1,6-difosfatasa y sedoheptulosa 1,7-difosfatasa a las cuales nos referiremos más adelante cuando hablemos de las fosfatasas.

Entre las proteínas pertenecientes al camino de transferencia de electrones fotosintético han sido identificadas y estudiadas fundamentalmente el citocromo 552; la ferredoxima-NADP-reductasa, dos citocromos tipo b 558 y 563, una piridín nucleótido transhidrogenasa y otras proteínas menos estudiadas.

i) Ferredoxina cloroplástica: esta proteína que contiene Fe es una piridín nucleótido reductasa y participa en la fotorreducción del $NADP^+$ por lamelas aisladas de cloroplastos de Euglena (San Pietro y Lang, 1958). Varios autores reportaron su presencia en E.gracilis (Shapiro, 1961; Smillie, 1963; Perini et al, 1964 y Nagai y Blach, 1966).

La proteína purificada de Euglena es similar a las aisladas de otras algas y plantas superiores y funciona entre la reducción del $NADP^+$ y las reacciones fotoreductivas en los cloroplastos de Euglena y de otras fuentes. Es una proteína autooxidable y contiene Fe y S lábiles a la acción de ácidos; es reducida bajo condiciones anaeróbicas por ditionito o por una mezcla de la transhidrogenasa cloroplástica y $NADP^+$ reducido, lo cual resulta en la desaparición de los picos de absorción a 420 y 460 m .

ii) Citocromos: los cloroplastos de Euglena gracilis contienen un citocromo tipo c, con una banda a 558 y 563 nm.

El citocromo 552 es una proteína soluble y está bien caracterizada, mientras que los otros dos están unidos a membrana y muchas de sus propiedades no han sido aún elucidadas.

Fue descubierto en células de Euglena por Davenport y Hill (1952); ha sido purificado y caracterizado por Perini et al (1964) y su rol como un carrier redox análogo al citocromo f de las plantas superiores, ligando el fotosistema II al fotosistema I fue establecido por Olson y Smillie, 1963.

Estudios de distribución intracelular (Smillie, 1963; Perini et al 1964 b), indicaban que el citocromo 552 estaba asociado totalmente con los cloroplastos sin embargo dependiendo del método empleado para la ruptura de las células el citrocromo puede pasar casi totalmente al sobrenadante y sólo una pequeña fracción sedimenta con la fracción cloroplástica esto podría llevar a pesar que esta proteína estaba localizada tanto en el citoplasma como en los cloroplastos o que realmente estaba asociado sólo a éstos pero sería liberada durante el tratamiento mecánico, lo cual daría lugar a una preparación de cloroplastos deficientes en citocromo 552.

Katoh y San Pietro (1967) demostraron que lo que ocurría era esto último, mostrando que el flujo de electrones desde el agua a $NADP^+$ y otros aceptores de electrones dependía estrictamente de la readición de citocromo 552 a una preparación de cloroplastos obtenida luego de un tratamiento de las células con una prensa de French.

Wildner y Hauske (1974) reportaron que cloroplastos aislados de Euglena gracilis Z retenían hasta un 50% de citocromo 552 comparado con el contenido de las células. El citocromo 552 se encuentra en cantidades iguales en los cloroplastos y en las células.

La cantidad retenida de citocromo 552 por los cloroplastos dependía del proceso de aislación de los cloroplastos; luego puede ser liberado de éstos por tratamiento mecánico o incubación con detergentes. Los autores concluyen por lo tanto que el citocromo 552 no está fuertemente unido a la mambrana sino "atrapado" en los tilacoides de los cloroplastos.

En el flujo fotosintético de electrones, funcionaría como un donor para el fotosistema I, mediando el flujo de los mismos desde el citocromo 558.

En otro trabajo Wildner y Hanska (1974 b) estudiaron detalladamente la localización del citocromo 552 en la membrana cloroplástica empleando anticuerpos anti-citocromo 552 (obtenidos inyectando el mismo citocromo 552 en ratones). Observaron que éstos no aglutinaban los cloroplastos ni tampoco inhibían el flujo de electrones desde el agua hacia $NADP^+$. Tampoco ejercían efecto alguno sobre la fotofosforilación cíclica ni sobre la fotooxidación del citocromo 552 endógeno.

Sin embargo, en presencia de un detergente (colato) la fotooxidación del citocromo era definitivamente inhibida por los anticuerpos.

La fotofosforilación cíclica no se restauraba por el agregado de citocromo 552 a la mexcla de reacción pero era estimulada "atrapando" el citocromo en las vesículas tilacoideas durante la sonicación; de manera que el coticromo 552 no era accesible a los anticuerpos. Concluyeron por lo tanto, que la localización y el sitio original de acción para el citocromo 552 endógeno es dentro de los tilacoides. Este sitio puede ser dislocado o expuesto a la acción de agentes externos durante la fragmentación de los cloroplastos.

Este citocromo puede ser clasificado como perteneciente al tipo c, debido a que posee varias propiedades análogas a las del citocromo c de mamíferos y plantas superiores.

Por ejemplo: las propiedades de absorción de los hemocromos de piridina y cianuro son similares a las de los hemocromos correspondientes preparados a partir de citocromo c de mamíferos. Es reducido por ácido ascórbico, borohidruro de sodio y ditionito de sodio; no es autooxidable pero puede ser oxidado lentamente por ferricianuro.

Las diferencias que presenta en cambio con los citicromos c de las plantas superiores son: en contraste al citocromo f se puede extraer fácilmente de las células; además su peso molecular es aproximadamente la décima parte del peso molecular del citocromo f y contiene sólo un grupo prostético hemo por molécula en lugar de dos.

Se diferencia de otros citocromos de bajo peso molecular presentes en algunas algas, en que tiene una banda α asimétrica y un alto contenido en triptofano (Perini et al, 1964 a).

Ben-Hayyim y Schejter (1973) estudiaron las propiedades del Hemo ligado al citocromo 552 o citocromo f de Euglena, con el objeto de establecer una comparación con el Hemo del cotocromo c de mamíferos.

A partir de sus resultados experimentales concluyeron que, a pesar que ambos difieren en su composición química y en su función fisiológica, algunas de sus propiedades son similares. Ambos citocromos tienen aproximadamente el mismo peso molecular y en los dos casos uno de los ligandos del Fe es un azufre de un resto metionina, por cuanto presentan una banda de absorción a 695 nm, en su estado oxidado, que indica que el sexto ligando del Fe hémico es un átomo de azufre de un residuo metionina.

La reducción del citocromo f de Euglena provoca la desaparición de la banda de absorción a 695 nm; varios tratamientos que producen cambios conocidos en la conformación del citocromo c parecerían tener efectos análogos sobre el citocromo 552. Por ejemplo, por calentamiento tiene lugar una desaparición gradual de la banda a 695 nm, modificándose así su estructura terciaria, obteniéndose para los diferentes parámetros termodinámicos de esta reacción, valores más positivos para el citocromo 552, lo cual indicaría que la conformación nativa del citocromo de Euglena tiene menos grados de libertad que el citocromo c y que la ruptura del citocromo 552 involucra la fractura de uniones no-covalentes más fuertes a la par que un cambio conformacional que el operado en el caso del citocromo o de mamíferos.

Por último, los autores demostraron que el producto carboximetilado del complejo de cianuro del citocromo 552 oxidado tenía las mismas propiedades que el citocromo c carboximetilado, bajo condiciones experimentales idénticas,

lo cual confirma que un átomo de azufre está involucrado en la coordinación con el Fe, en el citocromo oxidado de Euglena.

Con respecto a los citocromos tipo b, las células verdes de Euglena contienen el citocromo 563, el cual parece corresponder al citocromo b_6 de las plantas superiores (Hill, 1954). No se conoce mucho acerca de las propiedades de los citicromos tipo b de Euglena (Criddle y Park (1964) han solubilizado el citocromo b_6 a partir de cloroplastos de E. gracilis que se encuentra en éstos en estado oxidado y no muestra respuesta alguna a la iluminación a pH 6,5 (Ikegami et al, 1970).

Ikegami et al (1970) reportaron que este citocromo cambiaba rápidamente al estado reducido cuando los cloroplastos eran incubados a pH: 9,5; por lo tanto a pHs alcalinos, algunos reductores endógenos contenidos en los cloroplastos son capaces, aparentemente, de reducir este citocromo en oscuridad; debido probablemente a un cambio en el potencial de óxido-reducción del citocromo o de los reductores endógenos.

Bajo las diferentes condiciones experimentales usadas en este estudio, no se observaron, a pH: 9,5, diferencias apreciables en comportamiento entre el cit 563 y el otro cit, tipo b llamado cit 558. Así, en los cloroplastos de Euglena empleados en este trabajo, los fotosistemas I y II oxidarían y reducirían estos dos cit., respectivamente, en una forma similar; por lo menos a pH: 9,5. En oscuridad y a pH: 6,5, la mayor parte del cit. 558 en los cloroplastos estaba en estado reducido; su iluminación inducía una rápida, pero leve oxidación del cit. 558, la cual aumentaba en presencia de 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilure (DCMU); cuando se eliminaba la luz era rápidamente reducido a su nivel inicial.

A pH: 9,5 había también una apreciable re-reducción de ambos citicromos 558 y 563, cuando los cloroplastos se transferían a la oscuridad, luego de un período inicial de iluminación.

A partir de éstos y otros resultados Ikegami et al (1970) postularon que el cit. 558 presente en la cadena de transporte de electrones que también contiene al cit. 552 puede ser fotooxidado muy rápidamente por el fotosistema I; mientras que el citocromo 558 en otras partes de la cadena de transporte de electrones en la cual esté ausente el citocromo 552 puede ser oxidado sólo lentamente por ejemplo, a través de una difusión de electrones entre cadenas adyacentes. Por último, estos autores en base a un estudio cinético de las reacciones de los cloroplastos de Euglena con citocromo 552 y otros bastante complejos demostraron además la presencia de dos pools de carriers de electrones, uno de los cuales estaría ubicado del lado reductor del fotosistema II (pool A) y otro del lado oxidante (pool D).

En un trabajo reciente, Miller y Rapaport (1977) reportaron que el ci

tocromo 558 aislado de cultivos de E. gracilis crecidos en oscuridad tiene algunas diferencias en su estructura con respecto a la correspondiente a los citocromos c en general. Sabemos que éstos son proteínas que contienen un grupo prostético porfirínico unido covalentemente a través del Fe hémico y sus sustituyentes laterales.

Varias evidencias experimentales sugerían que el enlace covalente era a través de dos uniones tioéter, involucrando 2 residuos cisteína de la apoproteína. Recientemente, estudios realizados con citocromo c de levadura y corazón de caballo establecieron finalmente que la estructura de la "porfirina c", o sea la sustancia porfirínica obtenida por hidrólisis ácida del citocromo c era efectivamente una 2,4-di (α - S - cisteinil - etil) deuteroporfirina IX (Slama et al, 1975); confirmándose la hipótesis propuesta. A partir de este momento se consideró que ambas uniones eran necesarias para la función que debían cumplir estos compuestos, hasta la reciente demostración que en el citocromo 558 de Euglena gracilis (Lin et al, 1973) y en el citocromo 557 de Crithidia oncopelti (Pettigrew, 1972), el grupo hemo estaba unido covalentemente a través de sólo una unión tioéter; no obstante eran funcionales.

Por lo tanto, Miller y Rappoport (1977) consideraron de gran interés determinar la exacta naturaleza de esta unión monotioéter puesto que podría ser considerado, a partir de ese momento, la mínima unión necesaria para la función de, por lo menos, algunos de los citocromos c.

Aislaron el citocromo 558 a partir de células etioladas de E. gracilis y lo sometieron a una reducción con amalgama de sodio que rompió esta union una posterior esterificación rindió una porfirina idéntica a la porfirina sintética 2-vinil-4-etil deuteroporfirina IX y que el enlace monotioéter se encontraba en la posición 4-α - etil del hemo.

iii) Transhidrogenasa: es una flavoproteína que utiliza como sustrato NADH ó NADPH, aunque el significado fisiológico del primero como sustrato es dudoso debido a su baja afinidad por la enzima. En presencia de NADPH la enzima reduce varios aceptores, incluyendo $NADP^+$; ciertos análogos estructurales de $NADP^+$; 2,6 - diclorofenolindofenol; la ferredoxina cloroplástica; citocromo f o 552 (pero no el citocromo c de mamíferos), plastocianina, fitoflavina y flavin adenina nucleótidos. La reacción es reversible y se piensa que la enzima funciona "in vivo" como la enzima terminal de la cadena de transporte de electrones fotosintética, transferiendo electrones de la ferredoxima cloroplástica reducida al $NADP^+$.

La transhidrogenasa ha sido extraída a partir de polvos cetónicos de células verdes de Euglena gracilis Por Lazzarini y San Pietro (1963) y en sus propiedades generales se asemeja a la enzima purificada de hojas de espinaca.

Células adaptadas al crecimiento en oscuridad y células permanentemente blanqueadas, contienen cantidades apreciables de actividad de transhidrogenasa, aproximadamente 1/8 a 1/4 de la cantidad presente en células verdes hete

rotróficas. Las enzimas provenientes de cualquiera de estos 3 tipos de células parecerían ser idénticas en todas sus propiedades y características.

Mientras que las enzimas de células etioladas y blanqueadas están posiblemente localizadas en pequeños plástidos, las relativamente altas actividades encontradas en estas células, y los resultados de los estudios de distribución intracelular reportados por Smillie (1963), sugieren que, contrariamente a la opinión general, la enzima podría estar presente en los cloroplastos de las células verdes así como también en el citoplasma.

La iluminación de células adaptadas a la oscuridad resultó en un incremento rápido en la actividad de la transhidrogenasa luego de un lag inicial de 10 a 14 hrs (Lazzarini y San Pietro, 1963).

iv) Otras proteínas: Wolken (1961) obtuvo un complejo clorofila-proteína, al cual llamó cloroplastina, tratando las células con digitonina. Lewis et al (1961) también aisló de Euglena una proteína, posiblemente una flavoproteína, que catalizaba la fotooxidación del cit. 552.

Durante el curso de sus estudios empleando cloranfenicol, como inhibidor de la síntesis de proteínas en células en reposo, crecidas en la oscuridad de E. gracilis var. bacillaris, expuestas luego a la luz para inducir el desarrollo de cloroplastos, Vaisverg et al (1976) observaron una progresiva recuperación de la inhibición por cloranfenicol, demostrando que ella se debía a la acción de una ferredoxima-NADP reductasa, una enzima de la fotosíntesis perfectamente identificada, y que el poder reductor necesario para esta reacción provenía de una fuente externa a la maquinaria fotosintética del plástido, bajo el control de un fotorreceptor.

IV.4. ENZIMAS DEL METABOLISMO DE NUCLEOTIDOS Y ACIDOS NUCLEICOS

Se han encontrado y estudiado en Euglena las siguientes enzimas pertenecientes al metabolismo de los ácidos nucleicos:

a) Ribonucleasa, menos específica que la pancreática ya que degrada tanto a los ácidos poliuridílico y poliadelínico, como al RNA. Las propiedades de la ribonucleasa de Euglena fueron estudiadas por Fellig y Wiley (1960).

b) Con respecto a la síntesis de mucleótidos: se han identificado, por lo menos dos enzimas que convierten los mucleósidos en nucleótidos, en presencia de 5-fosfo-α-D-ribosilpirofosfato; una de ellas reacciona con adenina e hipoxantina y la otra con guanina y 8-azaguanina.

c) Síntesis y degradación del 3'-fosfoadenililsulfato: extractos de Euglena contienen un sistema enzimático soluble que cataliza la síntesis de 3'-fosfoadenilsulfato, intermediario en la síntesis de otros compuestos sulfonados. Las enzimas están presentes en extractos de células verdes, etioladas y blanqueadas con estreptomicina (Abraham y Bachhawat, 1964); así como también en extractos de cloroplastos aislados de Euglena (Davies et al, 1966).

En este sistema enzimático están involucradas, por lo menos, 2 enzimas: sulfato- adenilil transferasa y adenililsulfato

ATP + sulfato ⟶ adenililsulfato + pirofosfato

ATP + adenilil sulfato ⟶ ADP + 3'-fosfoadenililsulfato

También se ha demostrado en extractos de células vaerdes y etioladas de Euglena la presencia de una enzima que hidroliza el 3'-fosfoadenililsulfato (Abraham y Bachhawat, 1964).

d) Fosforólisis de Adenisina-5'- Difosfato ribosa: Evans y San Pietro (1966) y Stern y Avnon (1966) estudiaron una enzima de Euglena que cataliza irreversiblemente la reacción entre ADP-ribosa y ortofosfato para dar ADP + ribosa-5'-fosfato.

Se encuentra presente en células verdes y etioladas de Euglena y parecería no estar asociada a cloroplastos.

Además están presentes en extractos de Euglena enzimas hidrolíticas que actúan sobre ATP y UDP.

IV.5. ENZIMAS DEL METABOLISMO LIPIDICO

Han sido detectadas y descriptas en Euglena las enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos de cadena larga y en la conversión de ácidos grasos saturados a no-saturados. Además Bertini et al (1965) detectó en extractos de Euglena blanqueada con estreptomicina una arilesterasa que hidroliza los ésteres fenólicos.

Cheniae (1962, 1963, 1964) y Cheniae y Kerr (1965) describieron un sistema enzimático soluble en Euglena que cataliza la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga, a partir de Acetil-CoA. También se hallan presentes en Euglena dos sistemas enzimáticos para la formación de ácidos grasos no-saturados; uno predomina en células heterotróficas y el otro en células autotróficas (Nagai y Bloch, 1965).

El primero cataliza directamente la desaturación de tioésteres acyl-CoA de cadena larga y el segundo la formación de ácidos grasos de cadena larga, ya sea por elongación de ácidos grasos no-saturados de cadena corta o por medio de desaturasas específicas como por ej., la síntesis de ácidos oleico a partir de esteárico. Nagai y Bloch (1966) demostraron que participan en esta última reacción por lo menos, tres proteínas: una desaturasa específica; una NADPH oxidasa y la ferredoxina cloroplástica.

Podemos incluir además, dentro de las enzimas del metabolismo de los lípidos, aquellas que intervienen en la síntesis e interconversión de pigmentos, fundamentalmente los carotenoides. Aproximadamente el 75% de los carotenoides de las células verdes de Euglena se encuentran como epóxidos.

Bamji y Krinsky (1965) investigaron la disminución en la cantidad de

epóxidos que ocurre cuando células verdes en crecimiento son transferidas a la oscuridad bajo condiciones anaeróbicas.

Se demostró que homogenatos libres de células (verdes) son capaces de llevar a cabo una de-epoxidación de 5,6-epoxyxantina (anteroxantina), el pigmento más importante en células verdes, convirtiéndolo en zeaxantina; anaeróbicamente, en oscuridad y en presencia de FMNH2 (o una mezcla de malato, $NADP^+$ y FMH) como fuente de poder reductor.

IV.6. ENZIMAS DEL METABOLISMO DE AMINOACIDOS Y PROTEINAS

Se han encontrado en E. gracilis las enzimas "activantes de amino-ácidos", midiendo la formación de los hidroximatos de los aminoácidos en presencia de un extracto libre de células y una mezcla de aminoácidos, ATP, $MgCl_2$ e Hidroxilamina (Kistev y Eisens, 1972).

Estos resultados estarían indicando la presencia en Euglena, de dos enzimas cuya función catalítica individual en la célula es la adición de un aminoácido a su RNA soluble específico (aminoacil-s- RNA sintetasas).

Entre las enzimas metabolizantes de aminoácidos, se han detectado en Euglena gracilis de una hidrolasa de péptidos, la catepsina, cuya actividad era particularmente elevada en células privadas de carbono.

Schartz et al (1972) realizaron un estudio en cultivos sincronizados de Euglena, en presencia y ausencia de luz.

En la luz los cambios en el contenido de N y número de células mostraban dos fases distintas, una fase de crecimiento seguida de una fase de división; en las células crecidas en oscuridad, ambas fases ocurrían dentro del período de sometimiento a una elevada temperatura durante la sincronización.

El contenido de aminoácidos era aproximadamente el mismo en ambas células, crecidas en luz u oscuridad y los cambios en la cantidad de aminoácidos eran paralelos a los correspondientes al contenido de N total.

El camino biosintético del triptofano en todos los procariotes y eucariotes involucra 5 enzimas, acerca de las cuales se han observado una gran variedad de asociaciones, que van desde ninguna, en plantas superiores y muchas bacterias, es decir, las enzimas se han podido separar una de otra, hasta agregados múltiples en otras bacterias y hongos, incluso hay casos de una aparente fusión de genes. Un caso interesante y diferente de agregación enzimática múltiple en el camino del triptofano se ha encontrado también en E.gracilis (Lara y Mills, 1972) con la notable característica de que este agregado contiene cuatro de las cinco actividades enzimáticas, y solamente la primera enzima de la secuencia, y al mismo tiempo la regulatoria, antranilato sintetasa, separada del conjunto (Hankins y Mills), 1976, 1977).

Se debe destacar que los sistemas enzimáticos involucrados en la sín-

tesis de proteínas, en Euglena, han sido bien caracterizados en una serie de importantes trabajos; en contraste, no ocurre lo mismo con las enzimas individuales que catalizan la síntesis y catabolismo de aminoácidos y proteínas, que aún se están investigando.

IV.7. FOSFATASAS

Entre las enzimas que hidrolizan los ésteres de fosfato las más estudiadas son: i) fosfatasas ácidas no específicas; ii) fosfatasas específicas para fructosa k,6-difosfato y iii) pirofosfatasas.

i) E.gracilis contiene una fosfatasa que muestra actividad máxima a pH's ácidos; es no-específica e hidroliza compuestos tales como β -glicerofosfato, p-nitrofenilfosfato y O-carboxifanilfosfato.

El contenido de la fosfatasa ácida varía en las distintas cepas de Euglena gracilis; en células normales de Euglena gracilis Z es difícilmente detectable (Price, 1962; Smillie, 1964) y como sabemos su actividad es inducida por deficiencia de fosfato en el medio (Price, 1962; Blum, 1965).

Según Blum (1965) y Behhum y Blum (1966) las actividades constitutivas e inducibles corresponden a dos enzimas diferentes.

También se ha observado un aumento en la actividad de la fosfatasa ácida en células privadas de una fuente de carbono (Betini et al, 1965); pero esta enzima parecería ser distinta de la fosfatasa inducida por deficiencia de fosfato, puesto que poseen diferente localización intracelular.

Brandes et al (1964) consideraron que la mayor parte de la actividad de la fosfatasa ácida presente en células privadas de carbono, se encontraba en los cuerpos de Golgi; si éste fuera el caso, entonces la actividad inducible podría ser el resultado de una síntesis incrementada de la fosfatasa constitutiva presente en los cuerpos de Golgi.

ii) Euglena posee, al menos, dos hidrolasas que son específicas para el fosfato unido al carbono 1 de la fructosa k,6- difosfato; una de ellas posee actividad máxima a pH neutro en tanto que la otra a pH's alcalinos.

La fructosa k,6 difosfatasa neutra, se encuentra en células verdes y en mutantes blanqueadas permanentemente de Euglena gracilis.

La enzima ha sido purificada a partir de E.gracilis Z; es altamente específica para la fructosa 1,6-difosfato, siendo los productos de la reacción; fructosa 6- fosfato y ortofosfato.

Glucosa k,6-difosfato; ribulosa k,6-difosfato y varios ésteres monofosfato, incluyendo fructosa -1-fosfato y fructosa-6-fosfato son inactivos como sustratos.

La fosfatasa neutra presenta un pH óptimo de 7,3; a pH=8,5 la actividad disminuye un 50% y por debajo de pH=7 cae abruptamente inactivándose por completo a pH=6.

A diferencia de la enzima de otras fuentes, para la fructosa 1,6-difos

fatasa neutra de E.gracilis no se ha encontrado un mecanismo regulatorio sensible.

La fructosa 1,6-difosfatasa alcalina es una enzima integral del ciclo reductivo de carbono de la fotosíntesis y cataliza la conversión de 3-fosfoglicerato a hexamonofosfato.

Esta enzima está ausente, o se encuentra sólo en trazas en las mutantes blanqueadas con estreptomicina. Su actividad en células normales varía en forma paralela a los cambios en el contenido de clorofila durante el enverdecimiento de células etioladas (App. y Jagendorf, 1963); o durante la adaptación de células heterotróficas crecidas a la luz a un crecimiento autotrofico (Smillie, 1963). En células autótrofas la enzima se encuentra localizada en los cloroplastos.

Las propiedades de esta enzima son similares a las correspondientes a la difosfatasa neutra, excepto que el pH óptimo es más alcalino y la constante de Michaelis es aparentemente más alta.

La enzima alcalina también es específica para la fructosa 1,6-difosfato; y completamente inactiva frente a fructosa 1- fosfato, y ribulosa 1,5-difosfato (App. y Jagendorf, 1964; Smillie, 1964). Se inactiva muy rápidamente a medida que el pH disminuye; mientras la difosfatasa neutra muestra su máxima actividad a pH= 7,5, la de la alcalina ha disminuído un 10%.

Tampoco en este caso se ha encontrado un mecanismo de control, ni por el sustrato ni por ATP como ocurre en las enzimas de algunas plantas superiores.

Extractos de Euglena verde contienen también una sedoheptulosa-1,7-difosfatasa; si bien su actividad es muy baja (Peterkofsky y Racker, 1961).

Esta fosfatasa específica convierte la sedoheptulosa-1,7-difosfato a sedoheptulosa-7-fosfato y también parece funcionar en la fijación fotosintética del CO_2 (Bassham y Calvin, 1957).

iii) Ohmann (1964) demostró que extractos de Euglena gracilis contenían una pirofosfatasa inorgánica muy activa.

La actividad en células autotróficas y blanqueadas de E.gracilis Z era similar; sin embargo, parte de la actividad en el primer tipo de células estaba localizada en los cloroplastos (Smillie et al, 1963).

Por último, señalaremos que extractos crudos de E.gracilis contienen asimismo enzimas dependientes de Mg, las cuales liberan fosfato a partir de ATP y convierten UDP en uridina 5'-fosfato (Marechal y Goldemberg, 1964).

IV.8. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS NIVELES ENZIMATICOS CELULARES EN EUCLENA AUTOTROFICA Y HETEROTROFICA

Estudios realizados con el objeto de comparar los niveles celulares de

las enzimas involucradas en los distintos caminos metabólicos, en células de E.gracilis Z, crecidas en diferentes condiciones (autotróficas, heterotróficas, luz, oscuridad y células blanqueadas con estreptomicina) llevaron a la conclusión que los procesos más importantes en Euglena, el fotosintético y el respiratorio, son básicamente similares a aquellos encontrados en plantas superiores ya sea en células crecidas autotrófica o heterotróficamente (Peterkofsky y Rocker, 1961).

Así,por ejemplo, la $NADP^+$ gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa es una enzima cuya presencia esta restringida a células que contienen cloroplastos; y su actividad es mayor en células autotróficas que en células verdes heterotróficas, estando su nivel, por lo tanto, relacionado con el desarrollo de los cloroplastos.

De las enzimas glicolíticas, aquellas que también participan en la fotosíntesis, principalmente aldolasa, triosafosfato isomerasa y 3-fosfoglicerato quinasa, son ligeramente más activas en celulas verdes de Euglena que en células hetrotróficas crecidas en oscuridad; y lo opuesto es cierto para la enolasa y lactato dehidrogenasa.

Sin embargo, en general, la actividad de las enzimas glicolíticas, así como la de aquellas pertenecientes al camino oxidativo de las pentosas y al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, son similares en los diferentes organismos.

Además, si bien la actividad absoluta de las enzimas cambia con la edad del cultivo, la relación de las actividades de varias enzimas en cada organismo, permanece relativamente constante.

Dobrica y Ebringer (1963) ensayaron varias enzimas, como por ejemplo, piruvato quinasa y glutamato oxalacetato transaminasa y encontraron actividades comparables en células verdes y en dos cepas blanqueadas de E.gracilis, crecidas heterotróficamente con acetato.

Quizás la única excepción a estas generalizaciones sea el sistema mitocondrial de transferencia de electrones de Euglena, el que difiere en varios aspectos del presente en otros organismos.

Ammon, R. y Friedich, (1967) estudiaron las diferencias en el "equipo enzimático" de E.gracilis, resultantes de la adaptación de las células a un crecimiento en presencia o ausencia de luz.

Las actividades de aldolasa, triosafosfatoisomerasa, enolasa y fructosa-1,6-difosfatasa no diferían en ambas condiciones de crecimiento, coincidiendo con los resultados ya descriptos.

En las células verdes, las actividad de la fosfoglicéricoquinasa es 25 veces mayor que en las células etioladas; contrariamente, éstas presentan una actividad de la enzima málica aproximadamente 10 veces mayor que la encontrada en células verdes.

IV.9. VARIACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN RESPUESTA A CAMBIOS FISIOLOGICOS Y DEL MEDIO AMBIENTE

Las actividades de varias enzimas se modifican durante el crecimiento y la división de Euglena y a pesar que varios autores han reportado estos cambios, no se ha efectuado aún un estudio sistemático completo de los mismos.

En forma similar, los niveles celulares de ciertas enzimas también se modifican como respuesta a las variaciones nutricionales del medio, como por ejemplo, los efectos del acetato sobre los niveles celulares de la isocitrato dehidrogenasa y acetato tioquinasa; la disminución en la actividad de la lactato dehidrogenasa particulada en deficiencia de Zn y la inducción de la fosfatasa ácida no-específica en células deficientes en fosfato.

Varios investigadores han prestado una atención especial y demostrado un gran interés a los cambios en las actividades enzimáticas en Euglena como respuesta a otras dos condiciones fisiológicas:
i) en células privadas de una fuente de carbono para el crecimiento y
ii) en células que no se dividen pero con capacidad para formar cloroplastos.
i) Los cambios morfológicos que presentan las células privadas de una fuente de carbono han sido descriptos por Malkoff y Buetow (1964) y por Brandes et al (1964). Luego de la remoción de las fuentes de carbono exógenas, se produce una desaparición rápida de los gránulos de paramilón; una extensa vacuolización del retículo endoplásmico y la aparición de los citolisomas, los cuales incluyen y digieren secciones del citoplasma. A estos cambios se les suma una pronunciada disminución en el contenido de RNA, proteínas y de la capacidad exodativa (Blum y Buetow, 1963).

Esta pérdida en la capacidad oxidativa se debe, en parte, a la degradación de la mitocondria dentro de los citolisomas, debiendo operar al mismo tiempo, un segundo mecanismo más sutil, para dar cuenta de la significativa disminución en la capacidad oxidativa; ésta se recupera ráídamente cuando se suple a las células de la fuente de carbono apropiada.

Concomitantemente con la aparición de los citolisomas, se encuentran aumentadas las actividades de las enzimas que hidrolizan péptidos y ésteres de fosfato. Las actividades de la catepsima y fosfatasa ácida aumentan más de 5 veces durante los primeros 2 a 3 días de privación de carbono y luego disminuyen lentamente. (Bertini et al, 1965).

Los cloroplastos de las células verdes, privadas de fuentes de carbono exógenas son significativamente estables, aún si las células se mantienen en oscuridad.

Ben- Shaul et al, (1965) observó una ligera disminución en el contenido de clorofila en células mantenidas en ausencia de luz y de fuente de carbono

exógena durante 6 días; no obstante los cloroplastos no mostraban alteraciones de su estructura interna, permaneciendo prácticamente invariables.

Wilssner, W. (1968) estudió en células verdes la influencia de la nutrición con CO_2 o con acetato sobre las actividades de las enzimas típicas del ciclo Calvin y del glioxilato.

Comparó las actividades de la NADP- gliceraldehído dehidrogenasa y de la isocitrato liasa con el rol verdadero de la fotoasimilación indirecta (asimilación fotosintética de CO_2 liberado a partir de la oxidación de acetato) y directa (vía ciclo del glioxilato) de carbono a partir de acetato, en la síntesis de carbohidratos dependiente de la luz.

Demostró que el predominio de la vía del carbono de acetato a carbohidratos en la luz depende principalmente de la naturaleza autotrófica o fotoheterotrófica de los organismos; a pesar del hecho de que en células autotróficas la nutrición con acetato también induce la actividad de las enzimas necesarias para la asimilación directa del acetato.

Varios autores llegaron a conclusiones similares como ya se ha explicado en otros puntos; pero también podemos citar el trabajo realizado por Huth, W (1967) quién estudió las distintas enzimas en células verdes en relación a la fuente de carbono administrada. Varias algas que diferían cuantitativa y cualitativamente en su tipo de nutrición, se hicieron crecer bajo distintas cindiciones: fotosintéticas (autotróficas); con glucosa en la luz (mixotrófica) y en oscuridad (heterotrófica).

En Euglena gracilis la provisión de azúcar produce un cambio recíproco de la actividad de las enzimas fotosintéticas y citoplasmáticas, en la oscuridad. La actividad específica de las enzimas fotosintéticas sisminuye a medida que lo hace el contenido de clorofila.

En la luz, el suministro de azúcar no tiene influencia; pero si se provee a las células de acetato, se presentan síntomas de heterotrofía, aún en la luz.

ii) Ya se han descripto algunos de los cambios en las actividades enzimáticas en células que se están adaptando a condiciones de crecimiento autotróficas. Recordaremos, sin embargo que hay aumentos significativos en la actividad de las enzimas cloroplásticas, como en la $NADP^+$ -gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa y en el citocromo 552; pero variaciones pequeñas en los niveles celulares de las enzimas cloroplásticas que también funcionan en el metabolismo respiratorio (ej: aldolasa).

El desarrollo de los cloroplastos en Euglena gracilis involucra no sólo la síntesis de las proteínas funcionales de la fotosíntesis, sino también la formación de un nuevo sistema sintetizante de proteínas dentro de los mismos

cloroplastos (Brawerman, 1962; Eisenstadt y Brawerman, 1963, 1964 a, b) y además, la producción de enzimas que catalizan la síntesis de los diversos carriers que participan en la transferencia de electrones y componentes estructurales del cloroplasto.

Así, la aparición de nuevos sistemas para la síntesis de ácidos grasos no saturados en células autótrofas de Euglena (Nagai y Bloch, 1965, 1966) y la presencia de enzimas que sintetizan 3'-fosfoadenililsulfato en los cloroplastos (Davies et al, 1966), puede estar correlacionada con el elevado contenido de ácidos grasos no saturados y sulfolípidos en éstos.

La síntesis de clorofila y proteínas cloroplásticas no comienza inmediatamente después que células adaptadas a un crecimiento en la oscuridad se exponen a la luz; se observa un período lag (generalmente 8-12 horas) durante el cual tiene lugar un aumento en el RNA ribosomal plástido (Brawerman et al,1962). La aparición de este RNA ribosomal no sólo precede la síntesis de proteínas cloroplásticas, como el citocromo 552, sino que es esencial para su síntesis. Así, si se previene su formación por la adición de 5-Fluor uracilo, también se suprime la síntesis de la proteína, la síntesis de clorofila y la incorporación de Mn, componente esencial de las lamelas (Eyster et al, 1968). Puesto que el período efectivo de inhibición con 5-fuor uracilo se limita al período lag de síntesis de clorofila (Smillie et al, 1963), éste resulta ser un período crítico de síntesis de RNA junto con la formación de un nuevo sistema sintetizante de proteínas, el cual precede al período principal de síntesis de proteínas cloroplásticas. Además, varios autores han observado algunas diferencias en la velocidad de incremento de las distintas actividades cloroplásticas; especialmente en los primeros estadíos del desarrollo del cloroplasto.

Por ejmplo, Lazarini y San Pietro (1963) demostraron que en células en crecimiento la síntesis de transhidrogenasa, una vez inducida, prosigue a una velocidad constante con respecto a la biosíntesis de proteínas totales; mientras que la velocidad de síntesis de clorofila continúa aumentando.

Lewis et al, (1965) demostraron la aparición secuencial de antígenos cloroplásticos durante el desarrollo del cloroplasto en células que no están en división.

Puesto que los cloroplastos contienen DNA y un mecanismo para la síntesis de proteínas, se considera frecuentemente que son autónomos y en consecuencia, existe una tendencia a pensar en el desarrollo cloroplástico más como un proceso de biosíntesis de la organela únicamente, que como un proceso celular en el cual participan también procesos sintéticos de localización citoplasmática, en la formación de ciertos constituyentes cloroplásticos.

Sin embargo, algunos autores ya han demostrado que, durante el desarrollo de los cloroplastos, tienen lugar en el citiplasma cambios medibles en el

metabolismo proteico, existiendo además una estrecha relación entre ambos procesos.

Esta relación puede establecerse desde diferentes puntos de vista:

a) Represión de la síntesis de enzimas involucradas en la utilización de sustratos orgánicos del crecimiento: la formación de células autotróficas a partir de células heterotróficas, adaptadas a crecer en la oscuridad, está acompañada de la desaparición de ciertas enzimas citoplasmáticas inducibles. Por ejemplo, las células autotróficas pierden la isocitrato- liasa (Haigh y Beevers, 1964) y posiblemente las condiciones que favorecen el desarrollo del cloroplasto también favorecan la degradación de la enzima ya existente y la represión de la síntesis de isocitrato-liasa. Es de interés destacar que aquellos compuestos inductores de la isocitrato-liasa, como el acetato y el etanol, actúan también como represores del desarrollo cloplástico (App y Jagendorff, 1963); de tal forma que se mantiene un balance entre heterotrofía y autotrofía, dependiendo de la disponibilidad de sustratos para el crecimiento, distintos de CO_2.

b) Represión parcial de la síntesis de enzimas citoplasmáticas y utilización de proteínas citiplasmáticas para la síntesis de proteínas cloroplásticas: la síntesis de otras enzimas citiplasmáticas puede estar sólo parcialmente reprimida bajo condiciones que favorezcan el desarrollo autotrófico. Ya se han descripto en el punto ejemplos de este comportamiento; la actividad de la acetato tioquinasa en células autotróficas se reduce a 1/5 del valor hallado en células crecidas en presencia de acetato y el nivel de la paramilón sintetasa en células con cloroplastos es mucho menor que en células crecidas en oscuridad y alimentadas con glucosa.

La actividad de la aconitato hidratasa, pero no la de la $NADP^+$ -isocitrato dehidrogenasa, está también significativamente disminuída en células autotróficas (Cook y Carver, 1966).

Es lógico que se produzca una reducción en el nivel de aquellas enzimas claves del proceso resporatorio a medida que éste es reemplazado por la fotosíntesis como la principal fuente de energía celular. Hay evidencias, por lo menos en células que no están en división, que la síntesis de ciertas proteínas cloroplásticas ocurre a expensas de proteínas citoplasmáticas, ya que la actividad de éstas disminuye durante el desarrollo cloroplástico. Esta disminución coincide con el comienzo del período más activo de síntesis de proteínas cloroplásticas y parece estar ligado a él, puesto que la disminución en las actividades citoplasmáticas está retardado por aquellos compuestos que inhiben específicamente la síntesis de las proteínas plástidas.

c) Utilización del carbohidrato de reserva para el desarrollo cloroplastico: cuando se exponen a la luz células adaptadas a crecer en oscuridad, el carbono y energía requeridos para la síntesis de las proteínas y lípidos del cloroplas-

to, por lo menos en los estadíos tempranos de su desarrollo, deben ser provistos por las reservas existentes en la célula.

Efectivamente, células expuestas a la luz muestran un incremento en la actividad de las enzimas de la glicólisis; del camino oxidativo de las pentosas y del ciclo de Krebs.

Cambios similares se han encontrado para las enzimas laminaribiosa fosforilasa y β-1,3- glucanohidrolasa.

Los aumentos en actividad, así como la disminución del contenido del β-1,3- glucano ocurren durante el período lag en la síntesis de clorofila y luego dichas actividades incrementadas disminuyen rápidamente.

Si bien es cierto que la magnitud de estos cambios en las actividades de las enzimas respiratorias, inducidas por la luz, varía de una población celular a otra, está absolutamente comprobado que ellos ocurren y que pueden correlacionarse con la utilización del carbohidrato de reserva para reacciones sintéticas asociadas al desarrollo del cloroplasto.

Experimentos empleando β -1,3-glucano marcado con ^{14}C han confirmado estas ideas, ya que luego de la exposición de las células a la luz, aproximadamente la mitad de la marca se perdió como $^{14}CO_2$ durante las primeras 24 horas y la restante fue incorporada casi equitativamente en proteínas y lípidos.

d) Síntesis citoplasmática de proteínas cloroplásticas: puesto que los cloroplastos aislados pueden llevar a cabo la síntesis de proteínas, el cloroplasto es considerado "in vivo" el sitio de síntesis de proteínas plástidas.

A pesar de esto, según Beattie et al (1966) no se podría excluir la posibilidad de que ciertas proteínas cloroplásticas sean sintetizadas en el citoplasma, como en el caso de algunas proteínas mitocondriales.

Evidentemente este interrogante comenzaría a escalrecerse ó dilucidarse estableciéndose los sitios intracelulares para la síntesis de proteínas de plástidos y los roles relativos de los DNA, nuclear y cloroplástico.

Sin embargo, ya había sido demostrado la presencia en cloroplastos asilados de RNA mansajero con capacidad para llevar a cabo la síntesis de RNA dependiente de DNA, demostrando además que este RNA cloroplástico tenía propiedades totalmente diferentes del RNA citiplásmatico. Así según los autores de este trabakp. Eisenstadt y Brawerman (1964 a) sus resultados indicarían que los cloroplastos de Euglena gracilis poseen una "maquinaria" propia para la síntesis de proteínas distinas a la del citoplasma.

En un trabajo posterior estos mismos autores (1964 b) reportaron la presencia, en preparaciones de RNA ribosomal de Euglena gracilis, de RNA mensajero que se encuentra en cantidades sorprendentemente elevadas en los cloroplastos.

Además, de acuerdo con sus resultados, sugieren que los ribosomas poseen funciones regulatorias específicas en el proceso de síntesis de proteínas Las enormes diferencias en los niveles de RNAm presente en sistemas ribosomales de distintas fuentes, así como también la diversidad en la respuesta de los sistemas aislados a RNAm exógenos indicarían que los ribosomas podrían tener un rol importante en cuanto a la determinación de la naturaleza de sus interacciones con el RNAm "in vivo". Por lo tanto, sería posible que algunas características de la síntesis proteica estén gobernadas por las propiedades de las partículas ribosomales; y que alteraciones fisiológicas en este proceso estuviesen dirigidas en parte a través de modificaciones a nivel ribosomal.

Posteriormente, se demostró la presencia de DNA en los cloroplastos (Schiff y Epstein, 1965; Kirk, 1966) de Euglena gracilis; aunque este DNA estaría ausente en mutantes citoplasmáticas de Euglena incapaces de formar cloroplastos (Ray y Hanawalt, 1965; Edelman et al, 1965).

En 1967 Scott et al reportaron evidencias de que el DNA cloroplástico interviene en la formación de un sistema de síntesis proteica dentro de los cloroplastos mediante la codificación para el RNA de los ribosomas cloroplásticos.

Smillie et al (1967) comparando los efectos de dos conocidos inhibidores de la síntesis proteica, cicloheximida y cloranfenicol, en células conteniendo cloroplastos en diferenciación, demostraron que la síntesis de las enzimas (del estroma y de aquellos unidas a las lamelas) que intervienen en la fotosíntesis ocurre en los cloroplastos, sobre los ribosomas cloroplásticos; esto fue válido tanto para las enzimas del ciclo de Calvin como para las enzimas del camino de transferencia de electrones. Estas conclusiones encontraron apoyo adicional en el trabajo de Evans et al (1971) quienes emplearon un inhibidor del desarrollo de los cloroplastos en E. gracilis, el 5-Fluor-uracilo. Entre los varios efectos que tiene este compuesto a los cuales nos referiremos en otra sección, aquí nos interesa la particular inhibición que ejerce sobre la síntesis de una proteína localizada en el cloroplasto, el cit. 552, que en su presencia aumentaba la síntesis estimulada por la luz de varias enzimas citiplasmáticas. Además el agregado del 5-Fluor-uracilo al comienzo de la iluminación interfería, preferentemente, la síntesis de proteínas cloroplásticas comparada con la síntesis de proteínas citoplasmáticas, inhibiendo la formación de un sistema ribosomal, presumiblemente localizado en el cloroplasto y que participaría en la síntesis de las proteínas cloroplásticas.

Resultados incogruentes, por lo menos en parte, con los descriptos anteriormente fueron reportados por Bovamick et al (1974) en células que no estaban en división y en las cuales la síntesis de clorofila inducida por la luz era insensible a la acción de la streptomicina durante las primeras 12 hs. del desarrollo cloroplástico, pasado este período la síntesis se inhibía completa-

mente. Esto sugeriría que durante las prieras 12 horas de síntesis de clorofila no se requiere síntesis proteica sobre los ribosomas cloroplásticos.

La actividad de la ribulosa difosfato carboxilasa no aumenta apreciablemente durante este período; tampoco el contenido del cit. 552, en tanto que el nivel de la NADP-triosa fosfato dehidrogenasa no se altera por la presencia del antibiótico. Por lo tanto la síntesis proteica durante las primeras 12 hs. de desarrollo del aparato fotosintético no se ve afectado por estreptomicina, pero pasado dicho período, algunas reacciones se inhiben fuertemente.

Una excepción a este modelo lo constituye el desarrollo de la capacidad de fijación de CO_2, que se encuentra más fuertemente inhibido que la síntesis de clorofila, con eficiencias fotosintéticas bajas a las 12 hs.

Los autores sugieren que la formación de por lo menos un componente del aparato fotosintético, aún no identificado, podría inhibirse durante las primeras12 hs. del desarrollo cloroplástico.

En otro trabajo publicado por Bovarnick et al (en el mismo año (1974) confirma el hecho de que los grandes incrementos en la actividad de la ribulosa difosfato carboxilasa (RUDPCasa) y en la concentración de citocromo 552, siguen el modelo de síntesis de clorofila, en el cual la formación de estas 2 enzimas es inhibida luego de 12 hs. de comenzado el desarrollo cloroplástico, por estreptomicina (Sm) y por cloranfenicol (Cm).

Además ninguna de las enzimas pudo ser detectada en una mutante de Euglena que había perdido los cloroplastos y su DNA.

En contraste la enzima NADP-triosa fosfato dehidrogenasa (NADP-TPDasa) otra enzima localizada en los plástidos, aumenta su actividad sin el lag de 12 hs. observado para la síntesis de clorofila; este aumento además, no es inhibido ni por estreptomicina ni por cloranfenicol, pero sí por ciclohexímida que actúa sobre los ribosomas cloroplásticos.

Estos resultados indican que la NADP-TPDasa es codificada por DNA nuclear y transladada sobre los ribosomas citiplasmáticos, en cambio la sensibilizada, de la RUDPasa y del citocromo 552 a Sm y Cm indican que son transladadas por menos en parte, sobre los ribosomas cloroplásticos.

Resultados similares fueron obtenidos para otras 2 enzimas inducidas durante el desarrollo del cloroplasto: la DNAasa alcalina (Egan y Carell, 1972) y la fenil alanina-tRNA sintetasa (Reger et al, 1970). Estas enzima son codificadas por el DNA nuclear, o sea, sintetizadas en el citoplasma y luego transportadas al cloroplasto.

La síntesis de estas enzimas está reprimida en igual grado en células etioladas y en la mutante. Por lo tanto, parecería que la diferenciación de los cloroplastos en EUGLENA es dependiente de la informac.ón y maquinaria sintética

tanto de los plástidos como del resto de la célula.

Como la proteina celular total no varía significativamente durante el desarrollo cloroplástico en células en reposo, los autores sugieren que probablemente ocurre un recambio proteico.

Por otro lado, si el control de estas enzimas estuviese a nivel de un gen nuclear las condiciones normales de derepresión por la luz, podría involucrar una señal de los plástidos al núcleo o un fotoreceptor separado o distinto no-cloroplástixo, como ya había sido sugerido para la síntesis de RNA (Schiff y Zeldin, 1968; Schiff, 1971; Cohen y Schiff, 1973).

Una vez que las células son expuestas a la luz, los cloroplastos podrían ejercer, según los autores, un control sobre la cantidad de enzimas disponible para entrar en los plástidos.

é) Síntesis de enzimas citoplasmáticas involucradas en el metabolismo de productos fotosintéticos: otro grupo de enzimas citiplasmáticas cuya síntesis puede estar relacionada con la formación de los cloroplastos, son algunas enzimas implicadas en el metabolismo de los productos fotosintéticos excretados por los cloroplastos. Ejemplo de este grupo son las enzimas que metabolizan el glioxilato; glioxilato reductasa y serina glioxilato transaminasa. Otra enzima citoplásmica de interés es la malato dehidrogenasa, ya que las células autotróficas de Euglena gracilis contienen una iscensima de esta enzima que está ausente en células heterotróficas (Chanceller, Maddison y Noll, 1963).

En la mayoría de las células fotosintetizantes, el malato es uno de los compuestos que se marca rápidamente cuando se les suministra $^{14}CO_2$, postulándose que esa iscensima adicional encontrada en células autotróficas reaccionaría específicamente con el malato proveniente de la fotosíntesis.

'.10. DISTRIBUCION ENZIMATICA INTRACELULAR

Con el empleo de técnicas de fraccionamiento en solventes acuosos y orgánicos Smillie (1963) estudió la ubicación intracelular de las distintas enzimas presentes en Euglena gracilis; clasificándolas en 3 grupos: enzimas presentes sólo en los cloroplastos; enzimas presentes sólo en el citoplasma y enzimas presentes tanto en cloroplastos como citoplasma.

Varias enzimas respiratorias, como aldolasa y transcetolasa, se encuentran también presentes en los cloroplastos, donde presumiblemente intervienen en la fijación fotosintética del CO_2.

Las enzimas fotosintéticas están todas localizadas en los cloroplastos con la única excepción de una transhidrogenasa que también se encuentra presente en el citoplasma.

Las otras enzima, integrantes de los distintos procesos metabólicos, se encuentran distribuídas; en general, o bien en el citoplasma, o bien simultáneamente en citoplasma y cloroplastos.

V.- COMPOSICION Y METABOLISMO DE LOS CARBOHIDRATOS EN EUGLENA

V.1.- COMPOSICION

Los carbohidratos comprenden aproximadamente, un 50% del peso seco de las células de E. gracilis, aunque esta proporción está sujeta a variaciones con las condiciones nutricionales y la fase de crecimiento del cultivo.

Entre los hidratos de carbono presentes, se encuentra un pool endógeno de azúcares, oligosacáridos y azúcares fosforilados, pero el carbohidrato cuantitativamente más importante es el polisacárido paramilón, que se encuentra en forma de inclusiones granulares.

Además están presentes carbohidratos asociados a los galacto y sulfolípidos de los cloroplastos; por otro lado, los productos segregados por los cuerpos mucíferos son también, en gran parte, aunque no totalmente, carbohidratos.

V.2.- METABOLISMO

V.2.1.- Incorporación y utilización de hexosas:

En los euglenoides fotoautotróficos el CO_2 es la fuente primaria de carbono que se incorpora en los metabolitos celulares y compuestos estructurales.

Los euglenoides incoloros, heterótrofos obligados, son capaces de incorporar carbono, a partir de ácidos grasos y alcoholes de cadena corta, ciertos aminoácidos y en algunos casos azúcares, en los componentes celulares, incluyendo carbohidratos; como así también utilizar esos sustratos exógenos en procesos productores de energía.

Euglena puede sintetizar hexosas, así como metabolizar hexosas exógenas a través de los caminos de Embden-Meyerhoff y el oxidativo de los fosfatos de pentosa. Ya hemos señalado que en Euglena gracilis se encuentran las enzimas correspondientes a ambas rutas metabólicas.

La habilidad para usar hexosas varía según las especies y aún las cepas. El pasaje de hexosas y otras moléculas pequeñas a través de la membrana celular es probablemente un proceso activo y selectivo. Aún luego de haber pasado esta barrera, las moléculas serán metabolizadas sólo si están disponibles o presentes los sistemas enzimáticos auxiliares apropiados para su entrada en los caminos metabólicos intermedios. La situación puede ser aún más complicada puesto que dado el potencial genético, células incapaces de utilizar un cierto compuesto, ya sea debido a la pérdida del sistema de transporte necesario en la membrana celular o a la pérdida del sistema enzimático auxiliar o ambos, pueden adaptarse para utilizar el sustrato. Además en el caso de las hexosas (como ocurre con la glucosa), las condiciones ambientales en el cultivo pueden también influenciar facilitando o impidiendo su entrada y utilización.

Hay evidencias de que muchas cepas no pueden utilizar glucosa, debido a la ausencia de hexoquinasa (Hutner y Provasoli, 1951). Ohmann (1963) encontró que células de una determinada cepa de E. gracilis eran incapaces de utilizar glucosa o glucosa-1-fosfato, pero sí fructosa-1,6-difosfato y presentó evidencias de la ausencia en extractos libres de células, de ambas enzimas: hexoquinasa y fosfofructoquinasa. La no utilización de glucosa puede entenderse bien en términos de la falta de la hexoquinasa pero, según el autor, la ausencia de fosfofructoquinasa es difícil de explicar debido a la habilidad de Euglena de utilizar hexosa-fosfatos endógenos.

Varios trabajos han reportado la adaptación de células de E. gracilis a utilizar glucosa, cuando se la transfiere de un medio sin carbohidratos a otro que contiene glucosa, debido probablemente, a la inducción de la hexoquinasa, en algunas cepas, aunque quizás la adaptación pueda deberse a una síntesis inducida del sistema de transporte, en otras cepas.

V.2.2.- Gluconeogénesis:

Como ya se ha mencionado los euglenoides pueden crecer con varias fuentes de carbono que no sean hidratos de carbono los más investigados han sido acetato, etanol y succinato, habiéndose demostrado perfectamente la asimilación de los átomos de carbono de estos sustratos en carbohidratos (hexosa-fosfato y paramilón).

Además ciertos intermediarios del ciclo de Krebs y aminoácidos que también dan lugar a la formación de dichos compuestos, también pueden sostener el crecimiento de E. gracilis. En la Figura 55 se muestran las rutas probables hacia los productos: hexosa-fosfatos y paramilón.

Como ya se explicó antes, los pasos que llevan de fosfopiruvato a hexosafosfato involucran los mismos intermediarios que el camino glicolítico catabólico y las mismas enzimas con una única excepción: la reacción catalizada por la fosfofructoquinasa es irreversible y por lo tanto, se requiere una fosfatasa para hidrolizar la unión éster 1-fosfato. Ya hemos descripto la enzima encargada de catalizar esta reacción, la fructosa-1,6-difosfato neutra. En el esquema se observa también cómo los átomos de carbono de otros intermediarios del ciclo de Krebs pueden llegar a oxalacetato, por medio de las enzimas del ATC normal o por el ciclo del glioxilato. Asimismo ya hemos señalado la presencia en E. gracilis de la isocitrato-liasa, cuya actividad depende del estado nutricional de las células, teniendo las células autotróficas niveles menores que las heterotróficas, y de la malato sintetasa; ambas enzimas permiten que ácidos grasos de cadena corta, como acetato, puedan ser empleados para la síntesis de carbohidratos; por supuesto, junto con las demás enzimas del ciclo del glioxilato. Otros ácidos grasos y alcoholes, que soportan el crecimiento de Euglena pueden ser convertidos a acetil CoA por un proceso de oxidación y entrar en el camino gluconeogénico a través del ciclo del glioxilato.

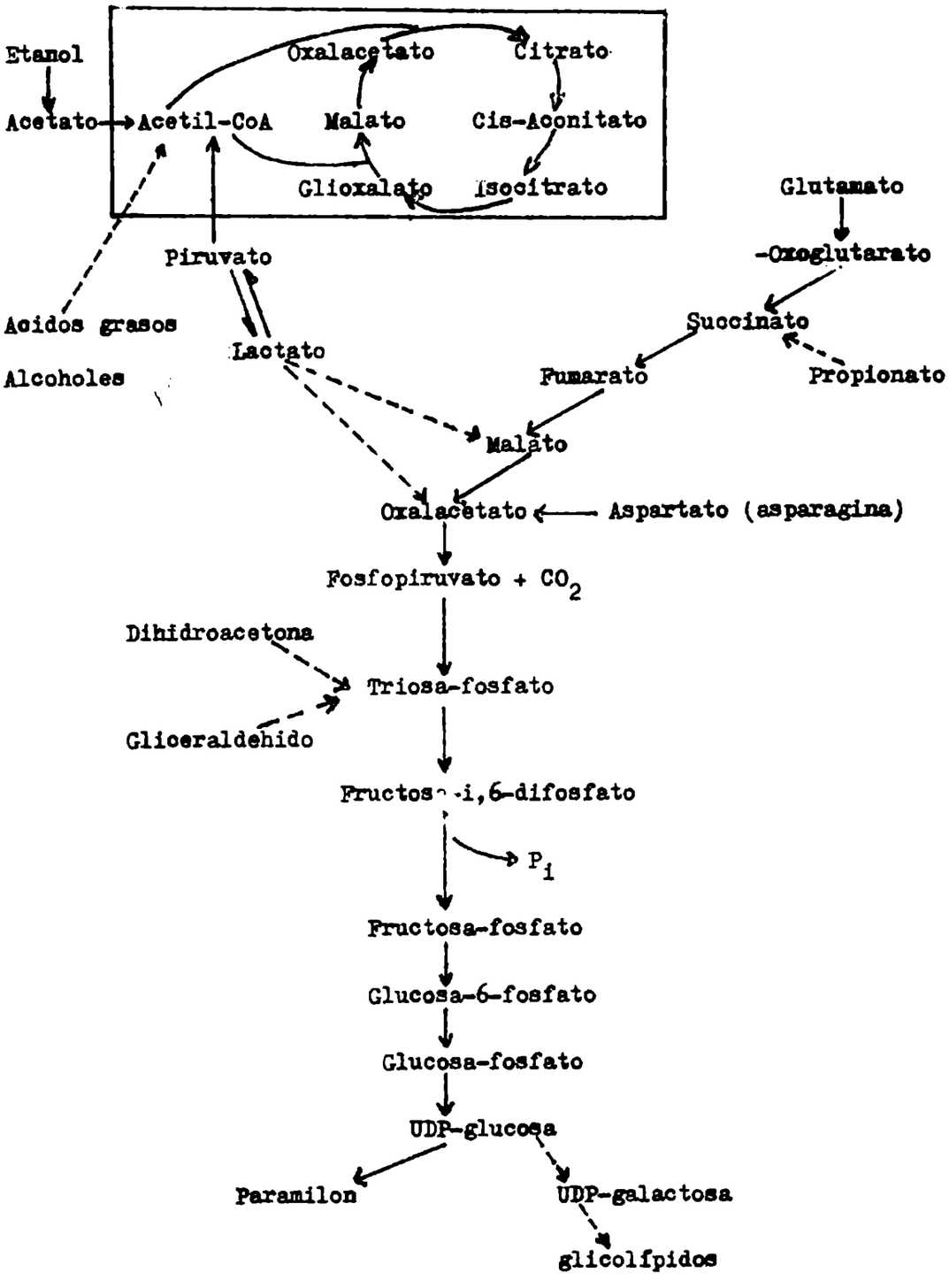


Figura 55 : Caminos generales de la gluconeogénesis. Las líneas punteadas representan reacciones no totalmente comprobadas en *Euglena gracilis*

La gluconeogénesis a partir de acetato fue estudiada por varios autores. Wilson y Danforth (1958) demostraron que el 42% del acetato utilizado era oxidado a CO_2 y el 48% restante era asimilado en carbohidratos.

Danforth (1961) empleando ^{14}C-acetato, marcado en el carbono del grupo carboxilo o metilo, encontró que la distribución de la marca en los carbohidratos presentes coincidía con la que correspondería al pasaje de dichos átomos de carbono por el ciclo del glioxilato. La utilización de acetato en la oscuridad por células crecidas autotróficamente requiere un período lag de adaptación y recién se llega a una adaptación completa luego de 4 generaciones (Cook, 1965). Esto probablemente se deba a la inducción de la acetato tioquinasa, necesaria para pasar acetato a acetil CoA (Bachhawat, 1962; Ohmann, 1964) y también de la isocitrato-liasa y malato sintetasa, las cuales tienen actividades elevadas en células crecidas en acetato y bajas en células crecidas con otras fuentes de carbono (Reeves et al, 1962).

Según algunos autores, ese lag podría deberse también a una inducción del sistema de transporte de acetato. Cook y Heinrich (1965) compararon el crecimiento de E. gracilis Z en glucosa y acetato y encontraron que ambos sustratos producían aproximadamente la misma velocidad de crecimiento, peso seco y contenido proteico durante la fase exponencial. Sin embargo, las células crecidas con acetato tenían un 50% más de RNA, que aquellas crecidas con glucosa; los autores sugirieron entonces que esto sería un reflejo de la inducción de las enzimas necesarias para metabolizar el acetato.

Wilson y Danforth (1958) demostraron que el etanol podría servir como una fuente de carbono para el crecimiento de E. gracilis; aproximadamente el 71% del total de carbono etanólico utilizado era asimilado, siendo los carbohidratos y posiblemente los lípidos, los productos principales (Eshleman y Danforth, 1964). Más carbohidratos, pero menos lípidos y proteínas, estaban presentes en células crecidas en presencia de etanol con respecto a células crecidas con acetato.

El camino de conversión de etanol a acetato, si bien no todos los autores coinciden plenamente, sería mediado por las enzimas alcohol y acetaldehído dehidrogenasas, como ocurre en otros organismos.

Por otro lado, si el succinato es la fuente de carbono empleada, éste entraría directamente en el camino gluconeogénico vía el ciclo del glioxilato, luego de penetrar en la célula por medio de un proceso activo específico.

La ruta para la fijación heterotrófica de CO_2 fue establecida por primera vez, por Lynch y Calvin (1953), quienes demostraron que la fijación de $^{14}CO_2$ en oscuridad resultaba en la marcación de los intermediarios del ciclo de Krebs y aminoácidos relacionados, hexosa y triosafosfatos y azúcar nucleótidos en el 80% de la fracción soluble en etanol de E. gracilis. La elocidad de incorporación en estos metabolitos era sólo una fracción de la correspondiente a la fijación fotosintética. Los productos marcados eran cualitativamente iguales pero diferían cuantitativamente. La ausencia de la inhibición de la incorporación de

CO_2 por malonato y la ausencia de marcación en el C 6 de fosfatos de glucosa en la fijación heterotrófica, indicaría que el camino para este proceso en la oscuridad difiere del correspondiente a la fijación fotosintética.

Si bien el camino metabólico de la fijación, en la oscuridad, de CO_2 no está totalmente aclarado, los diversos resultados obtenidos indicarían que lo más probable sería la carboxilación de los intermediarios de 3 átomos de C, para dar los ácidos de 4 átomos de C del ciclo de Krebs, Con respecto al metabolismo del paramilón, sus caminos de síntesis y degradación están bastante aclarados. Sabemos que se encuentran presentes en E. gracilis las enzimas necesarias para convertir G-6-P a UDPG o sea fosfoglucomutasa y UDPG fosforilasa.

En 1963, Goldenberg y Maréchal y en 1964, Maréchal y Goldenberg reportaron la presencia en E. gracilis de una enzima que transfería glucosa marcada desde el UDPG (pero no desde ADPG, TDPG o UDPG - β -G) a un glucano con las propiedades del paramilón. En E. gracilis, ésta es una enzima particulada, que aparentemente no necesita "primer" para la reacción, aunque existe la posibilidad de que exista un primer endógeno asociado con la proteína enzimática.

En la Figura 56a se representan los pasos involucrados en la biosíntesis de este carbohidrato de reserva. La depolimerización de este compuesto, se esquematiza e la Figura 56b, en la cual se indican sus posibles rutas de utilización.

Fellig (1960) reportó la presencia en E. gracilis Z de β -1,3-glucan hidrolasas solubles, que depolimerizaban laminarina.

Tocher (1962) y Meeuse (1964) examinaron diferentes extractos libres de células y encontraron que todas las preparaciones hidrolizaban la laminarina soluble pero ninguna atacaba a los gránulos nativos de paramilón.

Maréchal y Goldenberg (1964) encontraron que extractos de E. gracilis Z preparados por el método de Fellig (1960) degradaban el producto radioactivo e insoluble de la paramilón sintetasa, liberando glucosa-^{14}C; bajo condiciones similares la preparación hidrolizaba el paramilón de los gránulos tratados previamente con álcali pero no a los gránulos nativos.

Posteriormente otros autores reportaron evidencias de la presencia en extractos crudos de E. gracilis blanqueada de un sistema β -1,3- glucan hidrolasa, que actuaba liberando glucosa, rápidamente, a partir de laminarina insoluble y el cual estaría compuesto de una endo y una exo-hidrolasa.

Se consideró también, la posibilidad de una ruptura fosforolítica de oligosacáridos de β -1,3-glucosa, por la acción de una laminaribiosa fosforilasa, enzima soluble que había sido aislada de E. gracili Z, incapaz de actuar sobre los gránulos de paramilón nativos, ni tratados con alcali o el producto de la paramilón sintetasa durante su síntesis. Sin embargo, como esta reacción es reversible, la posibilidad de concentraciones localizadas de G-1-P, favorecerían la reacción inversa.

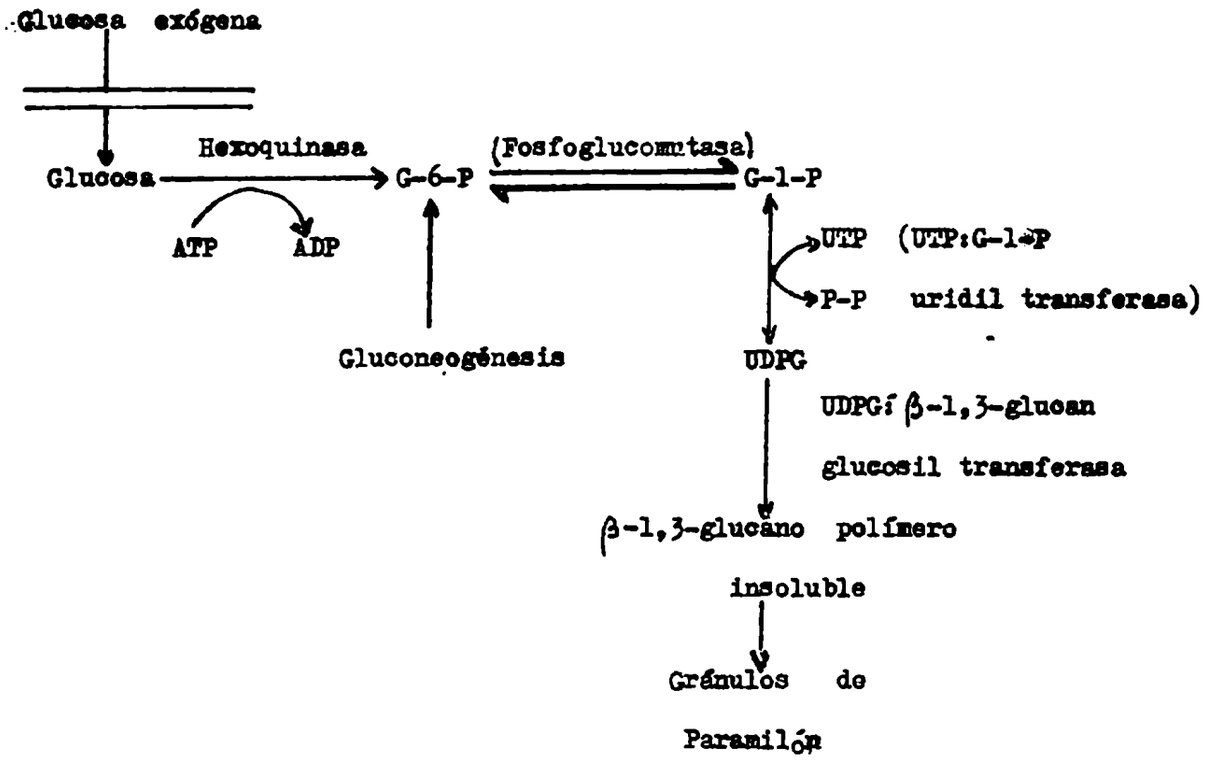


Figura 56a: Síntesis de Paramilón

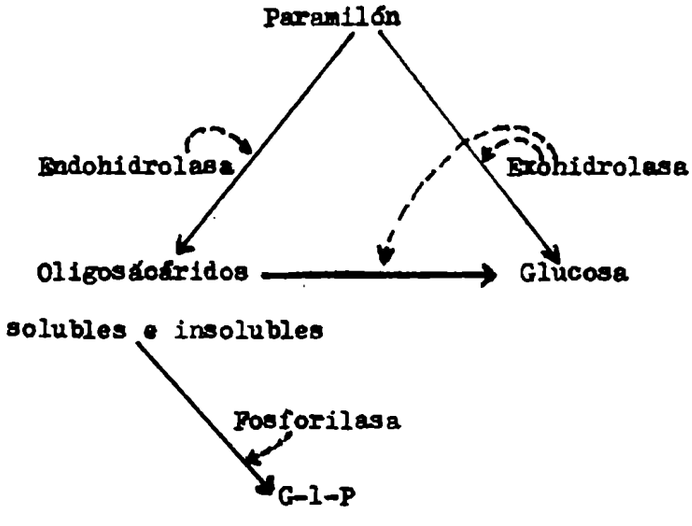


Figura 56b: Esquema tentativo para la depolimerización multienzimática de paramilón.

En 1968, Vogel y Barber aislaron de E. gracilis una enzima que degradaba el paramilón a simples residuos glucosa, siempre y cuando los gránulos sean previamente tratados con base diluída. Esta enzima, una -1,3-glucanasa tenía un pH óptimo de 5 y temperatura óptima de 60°C y no actuaba sobre los gránulos intactos. Considerando que hasta ese momento no se había logrado identificar y aislar una endohidrolasa (aunque sí había evidencias de su presencia), la inhabilidad de las fosforilasas de Euglena para degradar el paramilón y la presencia de una reacción mediada por una hexoquinasa depqndiente de ATP en el homogenato de Euglena, sugería según los autores, que la degradación del paramilón era el resultado de la hidrólisis por una glucanasa con la liberación de glucosas libres, las cuales serían luego fosforiladas y oxidadas por glicólisis.

Los estudios llevados a cabo, en condiciones heterotróficas, autotróficas y mixtas (auto y heterotróficamente) como así también los concernientes a respiración endógena, indican que el metabolismo del paramilón está sujeto a severos controles.

En cepas crecidas bajo condiciones autotróficas, por ejemplo, la acumulación de paramilón está controlada por la disponibilidad de energía atrapada fotosintéticamente.

Una vez comenzada la síntesis, la velocidad de la misma se incrementaba con un aumento de la intensidad luminosa, hasta un valor máximo a una intensidad de luz que también resultaba la saturante para todos los otros aspectos del crecimiento.

Por otro lado, el estudio de la distribución de ^{14}C a partir de bicarbonato o acetato marcados, en diferentes fracciones obtenidas bajo diversas condiciones de crecimiento, aportó considerables y claras evidencias del control estricto que la célula ejerce sobre la incorporación del carbono asimilado en paramilón y sobre su utilización selectiva durante la privación de fuentes exógenas de carbono.

Por ejemplo, en células en las cuales los cloroplastos se encuentran en desarrollo, el aumento en la velocidad de degradación de paramilón sería debido a la síntesis de las enzimas depolimerizantes, en tanto que el aumento en la velocidad de síntesis del polisacárido con el incremento de la intensidad luminosa podría deberse a una síntesis de las enzimas asociadas con la formación del paramilón o bien a la activación de las enzimas ya presentes.

VI.- COMPOSICION DE LOS LIPIDOS EN EUGLENA

La composición lipídica en *Euglena* comprende:

a) ácidos grasos: saturados, fundamentalmente mirístico y palmítico y no saturados, oleico y hexadecanoico;

b) ésteres de glicerol de los ácidos grasos: los cuales los podemos dividir en dos bloques importantes

i) glicéridos neutros (mono, di y triglicéridos)

ii) diglicéridos unidos a una molécula más polar, generalmente un éster de fosfato o un azúcar, encontrándose así dentro de este último grupo los fosfolípidos (fosfatidilcolina o lecitina; fosfatidiletanolamina; fosfatidilserina y fosfatidil inositol) y los glicolípidos (galactolípidos, sulfolípidos);

c) esteroles: el más importante es el ergosterol;

d) carotenoides: como anteroxantina, β-caroteno y neoxantina.

En general, podemos decir que los protistas "plant like" y las plantas superiores tienen, en su composición lipídica, una clase de glicolípidos que presenta como principales constituyentes ácidos grasos polienoicos con un pattern de dobles ligaduras específicas, como en el ácido linolénico.

En contraste, los protistas "animal like" y animales superiores generalmente sintetizan ácidos grasos polienoicos, que poseen dobles ligaduras alternadas correspondiente a la serie de los γ linolénicos y estos son constituyentes importantes de los fosfolípidos.

De acuerdo con los estudios llevados a cabo en *E. gracilis*, la información disponible sugiere todavía, otra alternativa. Estos fitoflagelados poseen capacidad para sintetizar ambas clases de ácidos grasos polienoicos, pero con la característica que seleccionan una u otra según cual sea finalmente la fuente de energía principal, determinada por las condiciones experimentales elegidas.

Aquellos organismos que obtienen su energía a expensas de la fotosíntesis parecerían requerir glicolípidos que contengan α-linolenato en su composición, mientras que aquellos que presentan un tipo de metabolismo heterotrófico requieren grandes cantidades de fosfolípidos que contengan ácidos grasos de la serie del γ-linolenato. Por lo tanto, es evidente que los glicolípidos que contienen α-linolenato formados por *E. gracilis* crecida en presencia de luz, están asociados con alguna función del cloroplasto; su localización en los cloroplastos de *Euglena* (así como en otros organismos fotosintéticos) apoya este concepto. Por supuesto, tales glicolípidos no son un requerimiento específico para la reacción bioquímica esencial de la fotosíntesis, puesto que todas las bacterias fotosintéticas y algas azul-verdes no los poseen (Harris et al, 1965).

Por otro lado, la ultraestructura del aparato fotosintético de E. gracilis algas verdes y plantas superiores es considerablemente más compleja que la de organismos fotosintéticos procarióticos y probablemente este aumento en complejidad tenga algún significado a nivel funcional.

La estructura específica de los glicolípidos que contienen α-linolenato, característica de E. gracilis verde (y otros organismos fotosintéticos eucarióticos) podría dar como resultados una disposición más eficiente de aquellos componentes de las lamelas cloroplásticas responsables de la transferencia de electrones fotosintética y de la fotofosforilación.

VII.- ACIDOS NUCLEICOS EN EUGLENA

VII.1.- CONTENIDO Y VARIACION

El contenido de RNA de E. gracilis Z varía entre 20 y 40 $\mu g/10^6$ células, pudiéndose encontrar valores mayores o menores, no incluídos dentro de este rango, debido a que la cantidad de RNA presente en Euglena puede modificarse significativamente con las condiciones de crecimiento.

Las células crecidas en ausencia de la luz, que han perdido los cloroplastos maduros, tienen menor cantidad de RNA y proteínas que las células verdes y se ha demostrado que el exceso de proteínas en estas últimas está asociado a los cloroplastos (Brawerman et al, 1962).

Sin embargo, la concentración de RNA cloroplástico sólo da cuenta en parte, del exceso de RNA presente en las células crecidas a la luz, habiendo evidencias de que también en la fracción microsomal de estas últimas se encuentra una mayor cantidad de RNA.

En contraste con las amplias variaciones en el contenido de RNA, los datos correspondientes a DNA muestran una mayor uniformidad, estando la mayoría de ellos en el rango de 3,0-3,3 $ug/10^6$ células. Tampoco se encuentran diferencias significativas entre células crecidas en presencia y ausencia de luz.

E. gracilis es un organismo susceptivle a alteraciones permanentes de su contenido de DNA. Así, cepas blanqueadas obtenidas por crecimiento a 34°C contienen niveles de DNA mucho más elevados que el de las células normales de las cuales derivan. Los datos reportados por Neff (1960), para dos cepas blanqueadas de E. gracilis (Z y T) revelan un aumento del 50% en el contenido de DNA.

Brawerman et al (1960) obtuvieron una cepa blanqueada de E. gracilis Z también por crecimiento a 34°C, que contenía el doble de DNA que las células normales crecidas en oscuridad; en este caso la cantidad de proteínas y de RNA también había aumentado significativamente. Sin embargo, este aumento en DNA no es una consecuencia necesaria del blanqueamiento ya que varias líneas celulares blanqueadas obtenidas por crecimiento a 34°C, o en presencia de estreptomicina, muestran un contenido normal de DNA.

Según Brawerman et al (1960) es posible que el aumento en este ácido nucleico no ocurra durante el proceso de blanqueamiento mismo sino que tenga lugar durante los cultivos subsiguientes.

VII.2.- RIBOSOMAS

Euglena posee dos tipos de ribosomas citoplasmáticos y cloroplásticos, los cuales pueden distinguirse fácilmente en las micrografías electrónicas de células verdes.

En ellas se pueden observar partículas ribosomales dentro del cloroplasto cuyo tamaño es menor que el de las partículas que se encuentran en el citoplasma circundante (70s y 80s respectivamente).

Ambos son capaces de promover síntesis peptídica; sin embargo, es interesante que tanto los ribosomas cloroplásticos como los cloroplastos mismos son inhibidos por cloramfenicol; en tanto que los ribosomas citoplasmáticos no se alteran por el agregado de este conocido reactivo. Esta diferencia en el comportamiento de las partículas aisladas, está de acuerdo con la respuesta "in vivo" de los sistemas sintetizantes de proteínas al cloramfenicol.

Además los ribosomas cloroplásticos presentan una característica poco común entre los sistemas libres de células no bacterianas y es su habilidad para responder a RNA mensajeros exógenos. Se ha demostrado también que carecen de especificidad propia con respecto à la determinación de la secuencia de los aminoácidos en las proteínas.

VII.3.- REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS CLOROPLASTICAS

La síntesis de las proteínas cloroplásticas está afectada por una variedad de factores ambientales, que sin embargo, no tienen efecto sobre el crecimiento celular.

La formación de los cloroplastos requiere la presencia continua de luz; cuando ésta no tiene lugar una consecuencia inmediata es el cese de la síntesis de proteínas típicamente cloroplásticas, como ser por ejemplo, las enzimas fotosintéticas solubles, que son proteínas estructurales.

También la síntesis de los cloroplastos está sujeta a una represión selectiva por una variedad de metabolitos (App y Jagendorf, 1963). Esto explicaría el número reducido de cloroplastos, cuando los cultivos se encuentran en su fase logarítmica, en un medio orgánico rico, pues se observa luego que a medida que las células se aproximan a la fase estacionaria comienza una rápida síntesis de los mismos, posiblemente como resultado de la disminución por consumo o agotamiento de esos metabolitos represores.

El estricto control regulatorio al cual está sometida la síntesis de proteínas cloroplásticas, se evidencia al estudiar el comportamiento de las mismas durante el blanqueamiento de las células por crecimiento a 34°C. En las primeras etapas de este proceso, el número de cloroplastos aumenta linealmente, mientras las células exhiben su crecimiento exponencial normal.

La formación por ejemplo, de la enzima fotosintética TPN-gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa aumenta, en forma paralela al contenido de clorofila.

Cuando el blanqueamiento se interrumpe, por exposición del cultivo a una temperatura menor, comienza una rápida síntesis de clorofila, luego de un prolongado lag; en este caso, la síntesis de la enzima también responde a un perfil similar al de la clorofila.

Como ya lo hemos mencionado en varias oportunidades, los cloroplastos tienen un sistema propio para la síntesis de sus proteínas, aunque como ya vimos parecería que no todas las proteínas cloroplásticas son sintetizadas sobre sus propios ribosomas.

En 1973, Harris et al estudiaron la incorporación de aminoácidos marcados y analizaron los productos de la síntesis proteica por cloroplastos aislados de E. gracilis. Encontraron que la incorporación de aminoácidos estaba sustentada por ATP exógeno o por fosforilación fotosintética y que era sensible a antibióticos que inhiben la síntesis proteica en bacterias (cloramfenicol), insensible a cicloheximida y sólo ligeramente sensible a actinomicina D y rifampicina. Puesto que los nucleósidos trifosfatos requeridos para la síntesis de RNA no estimulaban la síntesis proteica, no se requería una síntesis concomitante de RNA para alcanzar los niveles máximos de síntesis proteica. Los productos de ésta, analizados por cromatografía en columna y electroforesis en gel de pliacrilamida, incluían tanto proteínas estructurales como solubles, las cuales abarcaban un amplio rango de valores de pesos moleculares. Entre las proteínas de la fracción soluble se encontró actividad de ribulosa difosfato carboxilasa; sin embargo, no fueron detectados ni el cit. 552 ni la ferredoxima cloroplástica.

Cuando los autores efectuaron una comparación con las proteínas sintetizadas "in vivo", en el caso en el cual los ribosomas citoplasmáticos estaban inhibidos con cicloheximida observaron que la síntesis proteica obtenida "in vitro" coincidía con la producida "in vivo".

.- RESPIRACION

.1.-INTRODUCCION

La respiración es el equivalente funcional heterotrófico de la fotosíntesis o sea es el metabolismo de compuestos orgánicos como la fuente más importante de carbono y energía.

En estos flagelados éste es un proceso de "asimilación oxidativa" (Barker, 1936; Griffiths, 1965), en el cual un simple y único sustrato provee ambas fuentes para el crecimiento.

Prácticamente, todos los conocimientos acerca del metabolismo respiratorio de los euglenoides derivan de experimentos realizados empleando E. gracilis.

1.2.TRANSFERENCIA DE ELECTRONES Y FOSFORILACION OXIDATIVA

Los trabajos realizados por diferentes grupos de investigadores reportan evidencias que indican la presencia de 4 pigmentos citrocrómicos en E. gracilis: cit c (552, Euglena); cit tipo c (556, Euglena); cit b (561, Euglena) y cit tipo a (605, Euglena).

Sin embargo, se considera que sólo dos son componentes del sistema respiratorio de transporte de electrones, puesto que el cit 552 y el cit 561, como ya vimos, están localizados en los cloroplastos y no están presentes en cepas no fotosintéticas o en células crecidas en oscuridad (Perini et al, 1964 a, b; Gross y Wolken, 1960; Wolken y Gross, 1963; Smillie, 1963).

Los cit tipos a y c difieren en sus propiedades de los cit. convencionales de plantas superiores, mamíferos, e inclusive de los de otras algas verdes.

Buetow y Buchanan (1964, 1965) estudiaron en mitocondrias aisladas de Euglena, la fosforilación oxidativa acoplada a la transferencia de electrones. A pesar que éstas son capaces de fosforilación, el acople con la transferencia de electrones no es fuerte, o sea la oxidación de los sustratos y la transferencia de electrones al CO_2 ocurre a la misma velocidad, esté o no bloqueada la fosforilación por la ausencia de un aceptor de fosfato.

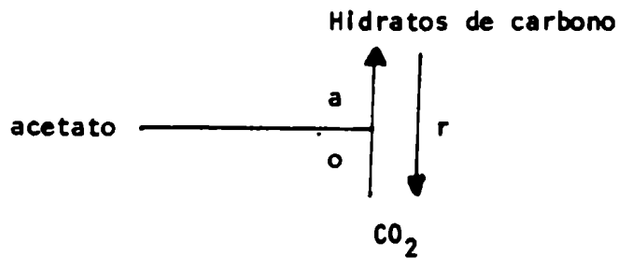
En otros organismos, un fuerte acoplamiento entre ambos procesos juega un rol muy importante en la regulación del metabolismo respiratorio. Si la pérdida de tal acoplamiento es una característica de la mitocondria "in vivo", como lo es "in vitro", entonces presumiblemente este mecanismo de control o bien no está presente o quizás no sea necesario para el metabolismo regulatorio de Euglena.

Los efectos del 2,4-dinitrofenol, amital, antimicina A y rotenona sobre la mitocondria de Euglena son similares a aquellos encontrados en mitocondrias de plantas y animales superiores, lo cual nos sugiere que a pesar de las diferencias encontradas, el sistema de fosforilación oxidativa de los euglenoides deben tener algunas reacciones en común con el de organismos multicelulares.

VIII.3.-VIAS DE OXIDACION Y ASIMILACION OXIDATIVA

Es conveniente considerar las reacciones involucradas como integrantes de tres caminos funcionales: oxidación del carbohidrato de reserva (paramilón); oxidación de sustratos de bajo Peso Molecular (acetato, etanol, intermediarios del ciclo de Krebs, etc.) y asimilación de sustratos de bajo Peso Molecular.

Podemos esquematizarlo como se muestra en el siguiente esquema considerando que la fuente de carbono agregada es acetato (Danforth, 1968)



donde r: reacciones de oxidación de la reserva
o: reacciones de oxidación del sustrato
a: reacciones de asimilación del sustrato

El grado de superposición entre estas 3 vías es sorprendente. Así el ciclo de Krebs, por ejemplo, funciona en la oxidación de la reserva y del sustrato y todas sus reacciones, con la excepción de 2 de ellas, son también componentes de la porción del ciclo del glioxilato correspondiente al camino de asimilación de sustratos.

Asimismo, varias de las enzimas glicolíticas que funcionan en la oxidación de sustratos, probablemente también lo hagan en la asimilación de sustratos.

Exceptuando el carbohidrato de reserva (paramilón), estos caminos metabólicos responden a los esquemas convencionales.

La presencia de trehalosa, como carbohidrato de reserva secundario y de la entrada del piruvato al ciclo de Krebs a través de su oxidación por la piruvato decarboxilasa como en las levaduras y final conversión en acetil-CoA, sugieren una posible y especial afinidad con los hongos.

En la formación de acetil-CoA, a partir de acetato por una acetato tioquinasa, Euglena se diferencia de aquellas algas como Chlorella y Scenedesmus.

VIII.4.RESPIRACION ENDOGENA

En ausencia de sustrato endógeno Euglena presenta una respiración endógena, en la cual se emplean los carbohidratos de reserva. Esto está apoyado por los hallazgos de que el contenido en carbohidratos de E. gracilis disminuye más rápidamente que el de proteínas y RNA durante la privación de carbono (Blum y Buetow, 1963; Kempner y Miller, 1965).

Luego de la transferencia de un medio con acetato a un medio endógeno (arrastrando una cierta cantidad de acetato), las células llevan a cabo 4 a 5 divisiones, luego sobreviven durante 13 días, a partir del momento en que cesó la división.

Cerca del 50% del carbohidrato desaparece durante las divisiones previas a la privación y cuando la división cesa ya no se observan gránulos de paramilón (Blum y Buetow, 1963; Malkoff y Buetow, 1964). Es razonable asumir, por lo tanto, que el paramilón y posiblemente la trehalosa (Marzullo, 1965) son los principales sustratos durante las fases tempranas del metabolismo endógeno. Danforth y Wilson (1961) reportaron evidencias de que las reservas de carbohidrato más recientemente formadas por la ruta de asimilación de sustrato son a su vez los primeros en ser reoxidados a través del camino de oxidación de la reserva (r) y propusieron que una "reserva lábil", al cual también contribuiría el paramilón. Como éste se distribuye en las células en forma de gránulos, es posible que las capas superficiales de los mismos sean las últimas en ser sintetizadas y las primeras en ser usadas.

VIII.5. UTILIZACION DE SUSTRATOS EXOGENOS

La habilidad de los euglenoides para usar sustratos exógenos como fuentes de carbono y energía es limitada y varía significativamente entre especies y aún entre cepas. Si bien ninguna explicación simple sería adecuada para dar cuenta de la especificidad en la utilización de sustratos en una determinada cepa o las diferencias entre cepas distintas, es indudable que la permeabilidad constituye un factor importante que limita la disponibilidad de los sustratos. Los diversos estudios realizados indican que los compuestos más rápidamente utilizados son los ácidos acético y butírico y sus respectivos alcoholes; los ácidos dicarboxílicos son raramente empleados mientras que los ácidos tricarboxílicos no son sustratos para ninguna cepa.

Con sustratos acídicos, la estimulación respiratoria es generalmente menor en medios neutros, pero aumenta a medida que el pH disminuye, posiblemente debido a que las moléculas no ionizadas penetran en la célula más rápidamente que los iones polares. A pHs aún más bajos, los ácidos débiles son marcadamente tóxicos (Danforth, 1953). El empleo de sustratos no iónicos como el etanol es independiente del pH (Eshleman y Danforth, 1964), pero es fuertemente dependiente de la concentración; Euglena crecida en etanol o acetato son similares en estas características.

Como generalmente ocurre, las moléculas pequeñas y débilmente polares penetran a través de la membrana celular más fácilmente que aquellas moléculas grandes o altamente polares.

Sin embargo, hay casos o ejemplos de especificidad de sustrato que no pueden explicarse por medio de las simples reglas de permeabilidad. Por ejemplo, el acetato puede penetrar en E. gracilis de acuerdo con dos mecanismos: uno que estaría de acuerdo con las reglas antes discutidas para ácidos débiles y el otro mediante un sistema específico de transporte, con la participación de permeasas. Es muy probable que exista un sistema de este tipo para varios sustratos, si bien específico para cada uno de ellos. Estas limitaciones de permeabilidad se pueden considerar como adaptaciones ecológicas a habitats que son altamente ácidos o ricos en productos de fermentación.

IX.- FOTOSINTESIS

IX.1.- COMPONENTES CLOROPLASTICOS

Los componentes de los cloroplastos de E. gracilis que intervienen en el proceso fotosintético pueden ser divididos en : i) Pigmentos; ii) Lípidos y iii) Proteínas.

i) Pigmentos: Si se tiene en cuenta que la clorofila a es un pigmento común a todos los organismos fotosintéticos por encima del nivel de bacteria y que la fotosíntesis no puede ocurrir en su ausencia, se concluye que éste es el pigmento fotosintéticamente funcional (o activo).

Si bien los carotenoides están siempre asociados a los organismos fotosintéticos, se sabe hoy que funcionan como pigmentos accesorios transfiriendo la energía a la clorofila y como agentes protectores contra la fotooxidación de la misma. Además, las evidencias indican que sólo una pequeña y especial porción de la clorofila a actúa en forma catalítica; la mayor parte puede ser considerada como pigmento "accesorio" o "antena", cuya función sería la de absorción y transferencia a la clorofila a fotoreactiva, de un modo similar a los otros pigmentos accesorios, los cuales incluyen, además de los carotenoides, las ficobilinas y otras clorofilas.

Como ya hemos visto la clorofila es una Mg-porfirina sustituída, que tiene un quinto anillo de ciclopentanona y un alcohol de cadena larga, fitol, esterificando un resto propiónico. La clorofila b difiere de la a en que el grupo metilo del C_3 está reemplazado por formilo y, como en el caso de la protoclorofila, se pierden los hidrógenos de los carbonos 7 y 8, introduciéndose un doble enlace en esa posición. Las feofitinas son las clorofilas en las cuales el Mg ha sido reemplazado por 2 H y las -filidas (por ejemplo, clorofilida) son aquellas que han perdido el fitol, por lo cual son ácidos monobásicos y las -forbinas se forman por remoción del fitol de las feofitinas.

Varios autores han estudiado las diferentes formas de la clorofila en Euglena, in vivo (Smith y French, 1963; Bogorad, 1962; Brody y Brody, 1963; Wolken, 1963; French, 1966).

Están presentes la forma de clorofila b que absorbe a 650 mu y las formas de clorofila a que absorben a 670 mu. Una tercera forma de clorofila a que absorbe a 695 mu se desarrolla cuando las células se hacen crecer en condiciones de baja intensidad de luz (aproximadamente 200 ft-c) (Brown y French, 1961); que suele encontrársela bajo distintos nombres según los autores, como ser, clorofila a 705 (Butler, 1961) o P700 (Kok y Hoch, 1961).

Según los estudios de Olson y Smillie (1963), existen dos sistemas de pigmentos funcionales, llamados según la nomenclatura de Duysens y Amez (1962): sistema I y sistema II. El sistema I se refiere a clorofila a de larga longitud de onda, que absorbe a 683 mu y otros pigmentos que funcionan con ella; con el

nombre sistema II se refiere a los pigmentos que absorben a cortas longitudes de onda, clorofila b y clorofila a 670, así como a todos aquellos pigmentos accesorios que transfieren energía luminosa a la clorofila a que absorbe a 670 mu.

La composición de carotenoides de células crecidas en luz y en oscuridad fue determinada por Krinsky et al (1964).

La neoxantina se encuentra sólo en células crecidas a la luz y la secuencia de su formación y desarrollo durante el enverdecimiento de cultivos etiolados, sugiere fuertemente que este carotenoide cumple un importante rol en la fotosíntesis. Krinsky (1966) propuso que un ciclo-epóxido, involucrando la zeoxantina y anteraxantina, podrían proteger la célula de oxidaciones fotosensibilizadas letales, puesto que demostró que la epoxidación de la zeoxantina tiene lugar sólo bajo condiciones (luz y O_2) que pueden producir fotosensibilización. Luego, la zeoxantina es regenerada por una de-epoxidación enzimática, en oscuridad, de la anteraxantina.

ii) Lípidos: La información acerca del rol que juegan los lípidos en la fotosíntesis, con respecto a la estructura y función del cloroplasto, ha sido obtenida a partir de la comparación de la composición lipídica en células verdes y etioladas.

La diferencia más importante entre ellas es el porcentaje de la fracción de lípidos totales asociada con los fosfolípidos y los galactolípidos.

En células crecidas autotróficamente, el 70% de los lípidos totales se encuentra en la llamada "fracción pigmento", la cual está compuesta fundamentalmente por galactosil-glicéridos; mientras que en células heterotróficas crecidas en oscuridad, sólo un 6% de los lípidos totales está asociado a esta fracción.

En contraste, el contenido de fosfolípidos totales de células etioladas es un 74% del total de lípidos comparado con sólo un 21% en células autotróficas (Hulanicka et al, 1964). Además, la "fracción pigmento" en células crecidas en ausencia de luz, está completamente desprovista de lípidos que contienen galactosa (Hulanicka et al, 1964).

Carter et al (1961) ya habían observado la ausencia de este tipo de lípidos en células heterotróficas.

Sin embargo, Rosenberg (1963) demostró la presencia de lípidos conteniendo galactosa en su composición, en células crecidas en ausencia de luz y en células blanqueadas; a pesar que, las primeras contenían sólo un 17% de galactosa en la fracción lípidos totales comparado con el contenido del azúcar en células verdes. El sulfolípido 6-sulfoquinovosil (1-1') diglicérido, ha sido detectado en ambos tipos de cultivos, verdes y etiolados, con la diferencia que en los primeros la mayor parte de los sulfolípidos se separa junto con la clorofila, sugiriendo que estos derivados se encuentran localizados principalmente en los cloroplastos (Davies et al, 1965).

Rosenberg y Parker (1964) han demostrado que la cantidad de sulfolípidos se triplica durante el proceso de enverdecimiento.

La función más importante de los lípidos más superficiales, tales como los galactosilglicéridos y sulfolípidos, sería la estabilización de las membranas lipoproteicas.

También, se ha estudiado la cantidad y calidad del contenido de ácidos grasos, con respecto al total de lípidos, en células cultivadas en presencia y ausencia de luz.

Así, se observó que existe una relación directa entre el contenido de ácido α-linolénico y la capacidad de producción de oxígeno. En células crecidas en oscuridad, el contenido de este ácido es sólo un 0,8% del total de ácidos grasos, mientras que en células crecidas autotróficamente, un 32% de los ácidos grasos totales corresponde al ácido α-linolénico (Erwin y Bloch, 1963).

Aproximadamente un 70% del α-linolénico encontrado en células verdes está asociado a los galactosilglicéridos y más de un 85% está localizado en los cloroplastos.

La cantidad de α-linolénico también depende de la concentración de CO_2 usada durante el crecimiento autotrófico (Erwin y Bloch, 1964); células crecidas en presencia de aire enriquecido con 5% de CO_2 contienen 4 veces más del ácido que aquellas crecidas en presencia de sólo 0.5% CO_2 en aire; el contenido de clorofila es esencialmente el mismo en ambas células, pero la velocidad de evolución es mayor en las primeras.

Otro ácido graso encontrado sólo en células verdes es el trans- 3-hexadecanoico, esterificado exclusivamente con fosfatidilglicerol (Van Deenen y Haverkate, 1966). Se ha sugerido que una asociación específica entre ambos es característica de aquellos organismos en los cuales la fotosíntesis es del tipo encontrado en plantas verdes superiores. Holton et al (1964) han sugerido que los ácidos grasos poliinsaturados serían, probablemente, componentes integrales de la membrana cloroplástica, su función sería de naturaleza estructural y no estaría relacionada con reacción bioquímica específica.

También han sido aislados de células crecidas autotróficamente (Threfall y Goodwin, 1964) quinonas tales como: plastoquinosa, α-tocoferol, α-tocoferol-quinona y plastoquinona c; encontrándose localizadas en los cloroplastos.

iii) <u>Proteínas</u>: Debemos considerar dentro de este grupo a aquellas proteínas que funcionan como: a) carriers en el transporte de electrones y b) enzimas que intervienen en la fijación de CO_2.

a) Ya nos hemos referido extensivamente a los citocromos que participan en este proceso y que se hallan localizados en el cloroplasto. Recordaremos solamente que fundamentalmente son: un citocromo tipo c, que absorbe a 552 mu, ausente en células crecidas en oscuridad, apareciendo junto con la clorofila durante el desarrollo del cloroplasto cuando las células se exponen a la luz.

Además, se encuentra asimismo localizada en el cloroplasto otra proteína hémica tipo b y, por otro lado, ha sido reportada la presencia de una NADP-reductasa activa en E. gracilis, cuya función sería la de transferir electrones desde la ferredoxina, también presente en los cloroplastos de E. gracilis, al NADP (San Pietro y Black, 1965). Parecería existir un nivel basal bastante significativo de esta reductasa en células etioladas y blanqueadas.

Estudiando los niveles de la NADP-reductasa durante el proceso de enverdecimiento, Smillie et al (1963) encontraron evidencias que parecían indicar la presencia de dos reductasas, una soluble y otra asociada a la fracción cloroplástica.

Con respecto a las características y función de la ferredoxina, ya nos hemos referido en el punto

b) Todas las enzimas del ciclo reductivo de las pentosas se hallan presentes en los cloroplastos de Euglena; como así también aquellas pertenecientes al ciclo de Calvin.

En cambio, las enzimas que convierten la fructosa-6-fosfato a UDPG, o sea, fosfohexoisomerasa, fosfoglucomutasa y UDPG-fosforilasa, no están localizadas en la fracción plástica. Por lo tanto, la sacarosa no es uno de los principales productos fotosintéticos de los cloroplastos de E. gracilis, como ocurre en las plantas superiores.

Chancellor, Madison y Noll (1963) han demostrado que células crecidas autotróficamente contienen una málico dehidrogenasa; que está ausente en células crecidas heterotróficamente.

Se sugirió que la forma adicional de la enzima podría deberse a su producción por mecanismos fotosintéticos o que puede estar reprimida en los heterótrofos debido a la presencia de malato en el medio.

IX.2.- CARACTERISTICAS DE LA REACCION DE HILL

Los extensos estudios de Olson y Smillie (1963) y Katoh y San Pietro (1967) en E. gracilis son consistentes con un esquema de fotosíntesis compuesto por 2 fotoreacciones conectadas por una cadena de transporte de electrones formada por citocromos; como había sido propuesto en 1960 por Hill y Bendall.

El reacoplamiento del sistema II al sistema I por el citocromo 552 comprueba claramente este esquema.

Katoh y San Pietro (1967 a) propusieron además que estarían involucrados 2 mecanismos independientes en la inhibición de la reacción de Hill por el calor y por venenos tales como DCMU y atrazina. El calentamiento destruiría la capacidad de los cloroplastos para oxidar agua, pero permitiría la oxidación de sustancias más reducidas que ésta, como por ejemplo, el ascorbato. La inhibición por los venenos, por otro lado, sería debida a un bloqueo en la transferencia de electrones desde el sistema II al citocromo 552.

IX.3.- FOTOFOSFORILACION

El primer reporte de fotofosforilación en Euglena provino de Eversole y Wolken (1958).

Años más tarde, Kahn en 1966 demostró que cloroplastos aislados de E. gracilis son capaces de catalizar una fotofosforilación no-cíclica con ferricianuro y una fotofosforilación cíclica con picoanina. Sin embargo, las velocidades observadas eran sólo un 20-10% de aquellas obtenidas con cloroplastos de espinaca.

Además, Kahn (1966) encontró que, tanto los cloroplastos aislados de células crecidas autotrófica momo heterotróficamente, exhibían la misma velocidad de fosforilación; aparentemente esos valores tan bajos de velocidad obtenidos eran el resultado de un lento transporte de electrones, más que la consecuencia de un posible desacoplamiento.

Chang y Kahn (1966) aislaron posteriormente, de cloroplastos de E. gracilis componentes proteicos de naturaleza enzimática que podrían actuar aparentemente, como un factor acoplante en la fotofosforilación y paralelamente como una ATP-asa dependiente de Ca.

Lo que aún no está totalmente aclarado es si la fosforilación ocurre en el sistema I o II, o quizás en ambos.

IX.4.- SISTEMA DE TRANSPORTE DE ELECTRONES EN CLOROPLASTOS DE EUGLENA

Los datos experimentales ya discutidos parecerían indicar que el sistema de transporte de electrones que operaría en cloroplastos de Euglena tendría varios puntos en común con el encontrado en otros organismos fotosintéticos; sin embargo quedan aún puntos por aclarar y por el momento podría aceptarse el esquema postulado por Ikegami et al (1970) (Figura 57), que todavía permanece vigente, habiéndose confirmado a posteriori algunas de sus originales propuestas.

IX.5.- FIJACION FOTOSINTETICA DEL CO_2

La fijación fotosintética de CO_2 comienza luego de 6 horas de exposición a la luz en células de Euglena crecidas en oscuridad, aunque la clorofila aparezca antes; esto indica, que la clorofila no es, al comienzo, capaz de participar en la fotosíntesis y nos lleva a pensar que la fijación de CO_2 depende de la síntesis independiente de nuevas proteínas enzimáticas.

Perl, M (1972) demostró que la síntesis de clorofila puede ser estimulada por cicloheximida, aunque la síntesis de proteínas estuviera inhibida sobre la fracción ribosomal 80S (citoplasmática); sugiriendo que lo que ocurría era que la cicloheximida estaba inhibiendo un sistema represor de la síntesis de clorofila, que a su vez era inactivado por una proteína sintetizada sobre los ribosomas 70S (cloroplásticos).

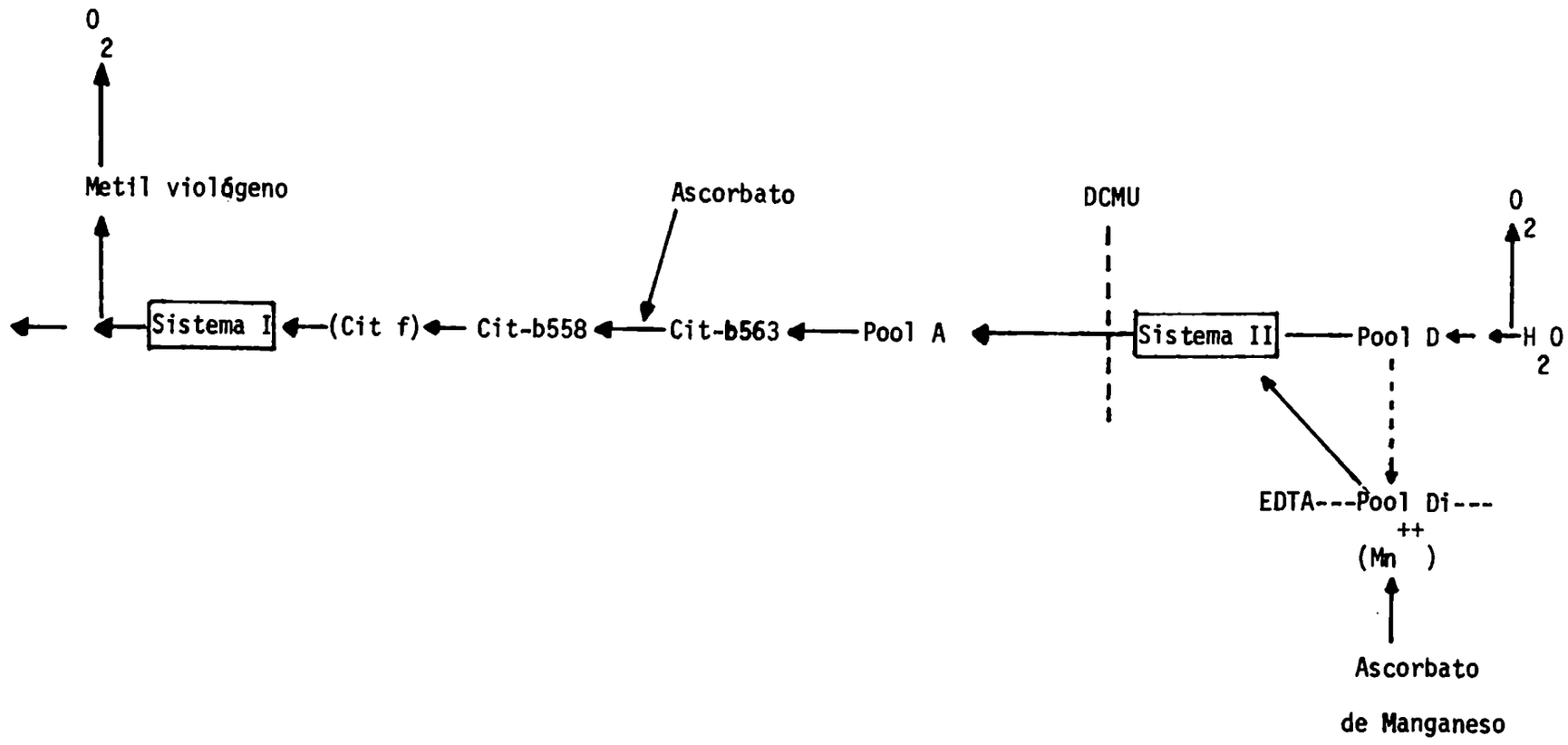


Figura 57 : Esquema tentativo para el transporte de electrones en cloroplastos de Euglena

Como ya dijimos los pasos de la fijación fotosintética de CO_2 en E. gracilis parecen ser los típicos encontrados en varias plantas superiores.

Usando cloranfenicol se ha demostrado que, por lo menos la aldolasa no-metálica, una enzima involucrada en este proceso, estaba presente en cantidades menores en células tratadas con la droga que en células no tratadas (Smillie, 1968).

Wolfovitch et al (1972) demostraron, empleando diferentes cantidades de cicloheximida y cloranfenicol en el medio de crecimiento, que la cicloheximida inhibe la síntesis de las enzimas del "sistema de fijación de CO_2 en la oscuridad"; mientras la síntesis de aquellas pertenecientes al "sistema de fijación de CO_2 en la luz" es estimulado, a bajas concentraciones de la droga. Esto indica que las enzimas de la fijación fotosintética del CO_2 son inhibidas por un producto de los ribosomas 80 S. El cloranfenicol actúa solamente sobre la síntesis de las enzimas del sistema que funciona a la luz, sin afectar al que funciona en oscuridad. La inhibición de la fijación de CO_2 puede explicarse por la inhibición de la síntesis de las enzimas esenciales para este proceso sobre los ribosomas 70S o por inhibición de la producción de un derrepresor por esta fracción ribosomal.

Usando concentraciones estimulantes de cicloheximida junto con cloranfenicol agregadas en el medio de crecimiento de Euglena, se observó que este efecto del cloranfenicol se podía revertir por el agregado de cicloheximida. Esto indica que el proceso de fijación de CO_2 en presencia de luz es activado por proteínas sintetizadas sobre los ribosomas 80 S; pero que a su vez es regulado por un represor sintetizado sobre la misma fracción ribosomal.

Además, este represor aparentemente pierde su actividad por un producto de la actividad de los ribosomas 70 S.

Comparando los resultados obtenidos para la síntesis de clorofila en presencia de ambos antibióticos, con los obtenidos para la fijación de CO_2 bajo condiciones idénticas, parecería que no existe una correlación directa entre los 2 procesos; el mismo contenido celular de clorofila, la fijación de CO_2 por unidad de peso de clorofila, disminuye a medida que aumenta la concentración de cloranfenicol.

Por lo tanto, según los autores, parecería que el desarrollo de la habilidad para producir las enzimas necesarias para fijar CO_2, durante la iluminación, es independiente del desarrollo del sistema enzimático para la síntesis de clorofila.

X.- INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO Y METABOLISMO

X.1.- ANTIBIOTICOS

a) El cloranfenicol, antibiótico de amplio espectro, aumenta ligeramente la proporción de células blanqueadas de E. gracilis y, como ya se había observado con actinomicina D previamente, se requieren concentraciones elevadas (1-2 mgr/ml) para inhibir totalmente su crecimiento en un medio con peptona, mientras que en un medio definido se requieren concentraciones menores para producir el mismo efecto (Loefer, 1951; Pogo y Pogo, 1965).

La cicloheximida, antibiótico tóxico para todos los eucariotes, actúa sobre Euglena inhibiendo la síntesis proteica (Umezawa, 1964), siendo su sensibilidad hacia esta droga similar a la de Chlorella (Morimura y Tamiya, 1964; Schrift, 1966).

La puromicina, como el Cm, es ampliamente usada como inhibidor de la síntesis proteica, actuando probablemente como un análogo de los grupos aminoacilos, en el RNA de transferencia (Goldberg, 1965).

Según los trabajos preliminares de Selsky (1964) Euglena verde no es inhibida diferencialmente por este antibiótico, en un medio neutro.

En 1967, O'Donnell y Alveda estudiaron los cambios producidos en el núcleo de E. gracilis como resultado del tratamiento con Actinomicina D, antibiótico que inhibe selectivamente la síntesis de RNA.

Las características sobresalientes de los cambios morfológicos inducidos, dependen en gran parte del estado del ciclo celular en que se encuentran las células durante la exposición al antibiótico. Pierde su efecto degradativo sobre material nucleolar preformado y sobre cromatina intra o extranucleolar pero, impide efectivamente la acumulación o depósito de dicho material nucleolar y matriz cromosomal.

En células tratadas por actinomicina D, por lo tanto, la integridad del núcleo permanece inalterada bajo condiciones experimentales, las cuales llevan a un agotamiento del material nucleolar.

Stewart et al (1969) estudiaron comparativamente el efecto de distintos antibióticos sobre el desarrollo de los cloroplastos y mitocondrias.

Cm y tetraciclina inhibían el desarrollo de ambas organelas; lincomicina y kanamicina afectaban predominantemente la capacidad de enverdecer de las células y la neomicina parecía ejercer una acción particular sobre ambas organelas.

Los colorantes euflavina y bromuro de etidio, no afectaban el desarrollo de los cloroplastos, pero, en cambio, inhibían muy efectivamente el desarrollo de la función mitocondrial.

Según Stewart et al (1969) los efectos del Cm y la euflavina sobre el desarrollo mitocondrial eran, aparentemente, reversibles; por el contrario, los efectos de aquellos antibióticos que inhiben la síntesis de clorofila en esas células, eran generalmente irreversibles, o sea, se comportaban como mutágenos cloroplásticos y sugirieron que esta acción mjtagénica podría ser una propiedad general de los inhibidores de la síntesis de las proteínas cloroplásticas.

Las diferencias en susceptibilidad o sensibilidad de las dos organelas a los compuestos estudiados y el contraste en la reversibilidad de los efectos observados sugerirían que existen importantes diferencias entre cloroplastos y mitocondrias en términos de la expresión de sus determinantes genéticos.

En 1969 Ben-Shaul y Markus reportaron los efectos del Cm sobre el crecimiento, distribución del tamaño celular, síntesis de clorofila y ultraestructura de E. gracilis. La velocidad de la división celular en Euglena crecida en presencia de luz, era significativamente mayor durante las primeras 36 horas, cuando estaba presente el antibiótico.

Por lo tanto los volúmenes celulares eran más pequeños; esta disminución en el volumen podría deberse al efecto inhibitorio del antibiótico sobre la síntesis proteica.

La explicación surge claramente del hecho que, normalmente, las células llegan a un cierto volumen crítico antes que comiencen a dividirse; en cambio las células tratadas probablemente se dividan antes de llegar a dicho volumen. Es interesante hacer notar que en las células que no estan en división, el Cm no afecta su volumen.

Según los autores el antibiótico quizás permita la división de células pequeñas, promoviendo así la división; la inhibición de las divisiones celulares aparecería más tarde en las células tratadas y esto podría ser el resultado de un agotamiento de los "pools" de proteínas.

En cambio, no detectaron promoción de la división celular en células tratadas, crecidas en oscuridad y expuestas a la luz; en este caso, la mayor parte del pool proteico sea probablemente usado para el enverdecimiento y por lo tanto, la disminución en el volumen celular no está acompañado por una promoción en la división celular.

Además, el Cm inhibe la síntesis de clorofila en células transferidas de oscuridad a la luz. En células verdes, en división, no tratadas, la disminución inicial en el contenido de clorofila/célula se explica por la inhabilidad de las células de sintetizar el pigmento a una velocidad comparable a la velocidad de división celular. Esto está en contraste con la situación observada en células tratadas, en división en las cuales se produciría una dilución del pigmento existente entre la progenie junto con la inhibición de nueva síntesis del mismo. En cambio, en células verdes en reposo y en células verdes, tanto en divi-

sión como en reposo, las cuales fueron transferidas a la oscuridad, el contenido de clorofila era similar. Parecería, por lo tanto, que cuando las células se mantienen en condiciones tales que no se sintetiza clorofila, el antibiótico no provoca una pérdida del pigmento ya presente. Observaron también que las células tratadas (verdes y en división) tenían menos tilacoides que las células controles, además de menor contenido de clorofila; esto confirmaría la hipótesis de Pogo y Pogo (1965) de que la inhibición en la síntesis de clorofila sería un efecto secundario de la inhibición de proteínas enzimáticas y estructurales.

Como ya dijimos, la inhibición de la división celular se observaba luego de 36 horas de exposición al antibiótico, mientras que la inhibición del enverdecimiento era inmediata; esto sugiere que este último proceso es más sensible al Cm que la división celular, indicando además, que la síntesis proteica es una necesidad mayor e inmediata para el enverdecimiento.

Desde el punto de vista estructural, no sólo observaron una inhibición de la formación de tilacoides sino también de la elongación de los plástidos.

En 1970, Kink reportó que la Ch (33 ugr/ml) no tenía efecto sobre la respiración ni motilidad de E. gracilis; sugiriendo entonces que este antibiótico no inhibía el metabolismo celular en este organismo.

b) Se ha estudiado también la sensibilidad de las células de Euglena a ciertos compuestos cititóxicos de gran interés como agentes antitumorales.

En un medio definido, pH=3,5, Euglena gracilis es sensible a ametopterina, azoserina, 6-mercaptopurina, anfotericina B y 6-diazo-5-oxo-L-norlencina; pero no a 7-azoguanina.

No ejercen sobre ella ningún efecto los siguientes compuestos: myleran; colchicina y cortisona; sin embargo la 5-fluornicotinamida es tóxica.

Mego (1964) observó que la inhibición producida sobre células verdes de Euglena por el agente antitumoral hadacina (ácido N-formilhidroxilaminoacético) es contrarrestada por adenina y aspartato; la antramicina produce albinización (Guttman y Tendler, 1966).

Euglena es insensible a la penicilina, mientras que tirotricina y patulina, resultan drogas tóxicas cuando se ensayan en un medio que contiene peptona y acetato.

Otro agente tumoral, hidroxiurea, en concentraciones de 0.02 a 0.035 M inhibe en un 50% la síntesis de clorofila y la división celular en células de E. gracilis Z crecidas en luz u oscuridad, siendo la síntesis de DNA más sensible que la de RNA o la proteica (Buetow y Mego, 1967).

X.2.- ANALOGOS DE LA PURINAS Y PIRIMIDINAS

Euglena puede tomar además del medio timina y timidina, pero no uridina y citidina; además las células verdes incorporan más timidina que las incoloras (Sagan, 2965). Esto evidencia la presencia de un sistema de transporte para nucleósidos así como para las bases libres.

También puede tomar guanina y adenina (Bolton et al, 1963; Sagan, 1965).

El 5-fluoruracilo, análogo efectivo de la piridina, inhibe el enverdecimiento de E. gracilis Z, siendo revertido su efecto por uracilo (Evans y Smillie, 1962). Sin embargo la incorporación de bromouracilo lleva a mutaciones plástidas (Scher y Collinge, 1965).

La 8-azaguanina, que retarda la división celular de Chlorella, sin afectar demasiado el aumento en la masa celular, no tiene efecto sobre Euglena. La insensibilidad de Euglena gracilis no se puede explicar por falta de la guanina pirofosforilasa, ni por una disminución en la permieabilidad o degradación de la droga, ya que se ha comprobado que células de Euglena convierten guanina, adenina, hipoxantina y 8-azaguanina en los nucleótidos correspondientes y además pueden incorporar 8-azaguanina en su RNA.

Euglena es resistente a la cafeína en concentraciones del orden de 0.01-0.03 M.

Varios benzimidazoles y 6-mercaptopurina compiten con la Vitamina B_{12} en el crecimiento de Euglena, en un medio con la cantidad mínima de B_{12} necesaria para el mismo. No se conoce aún con exactitud si estos análogos compiten por la parte dimetilbenzimidazol o deoxiadenina.

Reinisch y Funk (1966) reportaron que una mutante de E. gracilis Z, obtenida con benzimidazol, no sintetiza clorofila y tiene β-caroteno en lugar de 3-3'-dihidroxi-5,6-epoxi- β -caroteno que tenían sus padres, y, a diferencia de éstos, crecen bien en ausencia de tiamina o Vit. B_{12}.

X.3.- DESACOPLANTES E INHIBIDORES DE LA FOSFORILACION OXIDATIVA

El 2,4-dinitrofenol inhibe el crecimiento en un medio con exceso de fosfato y bajos pHs, efecto que es revertido por ácido glutámico (Hutner et al, 1958).

No existe mucha información acerca de los efectos de este tipo de compuestos sobre Euglena gracilis.

Ka... (1973) reportó que E. gracilis puede adaptarse reversiblemente a crecer en presencia de 2,4-dinitrofenol (DNF) y que las células resultantes difieren sólo en pocos aspectos de aquellas no-adaptadas. La adaptación no involucra una mutación puesto que una gran parte de la población celular total se adapta, y porque además ésta desaparece cuando se remueve el DNF.

Las células adaptadas pierden el control respiratorio, el cual puede demostrarse en células normales con la ayuda de oligomicina y DNF.

En un trabajo posterior, Kahn (1974) reportó que estas células adaptadas a crecer en presencia de DNF son al mismo tiempo, resistentes al efecto inhibitorio sobre el crecimiento de: carbonil-cianuro, m-clorofenilhidrazona, 1,7-hexafluoro-2,6-dihidroxi-2,6-bis (trifluorometil)-4-heptanona ("1799"), oligomicina y tri-n-butilclorotina. Las células adaptadas a crecer en presencia de cualquiera de estos compuestos eran, al mismo tiempo, resistentes al dinitrofenol.

Según Kahn, la adaptación es una respuesta a los efectos primarios de los desacoplantes, o sea, altos niveles de ADP; y no a los compuestos mismos, puesto que el arsenato inducía una resistencia desacoplante, mientras que los fenoles sustituídos, no-desacoplantes, no la inducían.

No obtuvo evidencia alguna acerca de la presencia de una proteína en las células, la cual pueda unir fuertemente a los desacoplantes; tampoco pudo detectar modificaciones de las reacciones en mitocondrias aisladas.

Observó solamente que la utilización de sustrato era apenas menos eficiente en las células adaptadas que en las normales.

Los inhibidores eran acumulados y no excluídos por las células; por ello, Kahn (1974) sugirió que la resistencia-cruzada implicaría, o bien una membrana mitocondrial modificada, impermeable a esos efectores hidrofóbicos, o bien un camino alternativo o significativamente modificado, para la síntesis de ATP, insensible a esos efectores.

El arsenito y el Pi son competitivos para E. gracilis crecida sobre acetato; además la respiración del acetato era inhibida por 0.001 M de tiofosfato, desacoplante de la fosforilación oxidativa (Danforth y Kaplan, 1964).

El fluoruro envenena a las células de E. gracilis y produce la acumulación de ácido γ -aminobutírico en el medio; este ácido fue luego independientemente identificado como un producto de excreción normal (Mc Calla, 1963).

X.4.- AGUA PESADA

Una vez que E. gracilis Z ha sido adaptada a crecer en un medio simple con glucosa, puede crecer en presencia de D_2O; las células que se desarrollan en estas condiciones son más cortas y anchas y tienen menor número de cloroplastos (Mandeville et al, 1964). Tyler y Estabrook (1966) sugirieron que el deuterio actuaba como un solvente hidrofílico, disminuyendo la protonación de un sitio activo en la cadena respiratoria.

X.5.- ANTIHISTAMINAS

Son agentes albinizantes, pero su toxicidad no tiene por qué estar relacionada con ese efecto.

Tong et al (1965) reportaron que algunas líneas de E. gracilis var. bacillaris albinizadas o blanqueadas con piribenzamina, crecidas en un medio con peptona y extracto de levadura, tenían una viabilidad disminuída.

Sin embargo Zahalsky et al (1962), reportaron que células blanqueadas con las antihistaminas: tripelenamina y pirilamina, en un medio definido, no mostraban alteraciones en su viabilidad.

X.6.- PESTICIDAS

Moore (1970) estudió los efectos de los pesticidas sobre el crecimiento y la sobrevida de células de E. gracilis Z.

Demostró que Vapam y Nabam eran más tóxicos e inhibían la fotosíntesis y el crecimiento en un grado mayor que el maration y paration.

El Nabam resultó ser el pesticida más tóxico para E. gracilis Z, entre todos los fungicidas progados; su efecto letal no se podía prevenir por la presencia de cationes divalentes.

Paration, Vapam o Nabam, en concentraciones de 10 ppm, no afectaban la respiración durante un período de 80' en presencia de 0,01 M de glucosa.

X.7.- AGENTES QUELANTES

El efecto de algunos agentes quelantes en E. gracilis fue estudiado por Dubash y Rege y reportado en el año 1970.

Demostraron que la 8-hidroxiquinolina (8-HQ) y la cisteína inhibían significativamente la síntesis de clorofila en células de E. gracilis etioladas, no-proliferantes, expuestas a la luz. Según los autores, esto puede deberse, al menos en parte, a la unión de estos agentes al Mg, en el medio no-proliferante; pero también es seguramente, una consecuencia de la acción quelante intracelular.

El efecto de la 8-HQ podía revertirse por la presencia de iones metálicos tales como el Zn y el Ca.

Encontraron, además, que el dietilditiocarbamato sódico (Na-DDC) y el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) no tenían efecto sobre la síntesis de clorofila en condiciones no-proliferantes.

Todos estos agentes afectaban también el crecimiento, siendo este efecto mayor en la luz que en la oscuridad; esto se debe, evidentemente, al requerimiento diferencial de Mg bajo ambas condiciones de crecimiento.

XI. CLOROPLASTOS

XI.1. DESARROLLO MORFOLOGICO

Si bien Euglena necesita luz para la formación de sus estructuras plástidas y síntesis de clorofila, al igual que las plantas superiores; otros organismos, como la mayoría de las algas, no poseen dicho requerimiento.

Luego de varias generaciones de crecimiento en la oscuridad, las células de Euglena pierden toda su clorofila y sólo contienen protoclorofila (ida) (Schiff et al, 1961 b).

Las micrografías electrónicas revelan la presencia en estas células de proplástidos, de aproximadamente 1 μ de diámetro, con una o dos membranas y partículas del tamaño de los ribosomas (Liss et al, 1965); encontrándose alrededor de 30 proplástidos por célula (Epstein y Schiff, 1961).

Cuando las células, en esas condiciones, se exponen a la luz, comienza el desarrollo del cloroplasto, estén las células dividiéndose o no. Manteniéndolas en las condiciones apropiadas para que no se dividan (medio en reposo o "resting medium"), es posible estudiar el desarrollo cloroplástico, independientemente de la división celular.

Los eventos morfológicos que tienen lugar durante este proceso podemos describirlos resumidamente de la siguiente manera:

1) Las membranas, que luego darán lugar a discos, se invaginan a partir de la membrana proplástida interna.

2) Estos discos se fusionan uno con otro, longitudinalmente, para formar las lamelas, que contienen aproximadamente 2 a 4 discos.

3) La región pirenoidea se diferencia luego de 18-24 horas de comenzado el proceso de desarrollo.

4) El número máximo de lamelas se alcanza a las 72 horas de desarrollo del cloroplasto, que es el tiempo al cabo del cual se considera que finaliza este proceso (Epstein y Schiff, 1964; Ben-Shaul et al, 1964).

XI.2. DESARROLLO FISIOLOGICO:

XI.2.1. Pigmentos:

Cuando se iluminan células crecidas en la oscuridad, se forma inicialmente cierta cantidad de clorofila a, inducida por la luz; luego continúa aumentando lentamente durante aproximadamente 10 horas; pasado este período la formación de clorofila a se incrementa rápidamente en forma casi paralela, a la velocidad a la cual se están formando las lamelas. Más adelante volveremos a discutir este proceso en base a aportes experimentales más recientes, ahora nos ocuparemos de los restantes pigmentos presentes en los cloroplastos.

La clorofila b es muy difícil de medir ya que aun en células completamente desarrolladas constituye sólo una pequeña fracción del contenido total de clorofila.

Las células crecidas en oscuridad contienen una apreciable cantidad de carotenoides (Sterne et al, 1964 a; Krinsky & Goldsmith, 1960) y cuando se induce el desarrollo del cloroplasto, por iluminación, el aumento de los carotenoides es paralelo al de clorofila a.

El carotenoide ausente en células etioladas es la neoxantina, que aparece por primera vez a las cuatro horas de comenzado el desarrollo del cloroplasto y luego continúa aumentando, como así también lo hacen los ya presentes en ausencia de luz (Krisnky et al, 1964).

XI.2.2. Fotosíntesis:

Con respecto al proceso fotosintético, el primer evento que puede medirse por intercambio gaseoso, cuando se iluminan células crecidas en oscuridad, es un significativo e irreversible incremento en la velocidad de incorporación de oxígeno (Schiff, 1963).

Esto representa, indudablemente, un aumento en la respiración, con el fin de movilizar energía para la síntesis de los constituyentes cloroplásticos.

Superpuesto a este cambio se puede detectar una pequeña y reversible incorporación fotosintética de oxígeno.

A medida que procede el desarrollo del cloroplasto, esta incorporación reversible es gradualmente compensada hasta que, transcurridas aproximadamente 4 horas del mismo, se encuentra balanceada por la evolución fotoinducida de oxígeno; de aquí en adelante hay un incremento neto en la evolución fotosintética de oxígeno.

Por lo tanto, se puede considerar que el momento en que comienza la fotosíntesis, se encuentra cercano a las 4 horas de iniciado el proceso de desarrollo del cloroplasto.

La fijación fotosintética de CO_2 empieza aproximadamente a las 6 horas de desarrollo (Stern et al,1964 a; Brody et al, 1965; Wolfovitch y Perl, 1972); y, en general la velocidad de fotosíntesis, durante el desarrollo es paralela a la velocidad de formación de pigmentos y lamelas.

La intensidad de luz óptima para el crecimiento en Euglena es aproximadamente 100 ft-c; intensidades mayores o menores rinden menor cantidad de clorofila; además bajas intensidades también llevan a un desarrollo anormal del cloroplasto (Stern et al, 1964 b; Ben-Shaul et al, 1964).

XI.2.3. Síntesis proteica:

Puesto que el desarrollo del cloroplasto tiene lugar, normalmente, en un medio desprovisto de fuentes de carbono y nitrógeno, es de interés saber si la formación del cloroplasto involucra la síntesis "de novo" de las proteínas o alternativamente, si éstas ya existían en las células crecidas en oscuridad y son simplemente "empaquetadas" en los cloroplastos cuando las células se iluminan.

Una forma de enfocar el problema es medir las actividades enzimáticas a lo largo de este proceso; así, se ha observado que varias de las enzimas plástidas aparecen durante el desarrollo: TPN - Triosa fosfato dehidrogenasa (Fuller & Gibbs, 1959; Brawerman & Konigsberg, 1960); TPN-transhidrogenasa (Lazzarini & Wooddruff, 1964; Lazzarini y San Pietro, 1963) y ribulosa difosfato carboxilasa (Fuller & Gibbs, 1959).

Por determinaciones espectroscópicas ha sido posible demostrar que el citocromo 552, localizado en los cloroplastos, se forma también durante su desarrollo (Nishimura, 1959; Wolken & Gross, 1963; Perini et al, 1964 a, b), a una velocidad que mantiene la relación citocromo: clorofila en el valor del cloroplasto maduro 1:400.

Además, todos los trabajos que trataron de dilucidar si las proteínas cloroplásticas estaban codificadas por el DNA nuclear o citoplasmático, y que ya han sido discutidos en el punto VII.3, confirman que existe una síntesis de "novo" de las proteínas cloroplásticas, independientemente que su origen sea núcleo (NADP-triosa fosfato dehidrogenasa) o cloroplástico; en este último caso, la síntesis comienza luego de un lag (10-12 hrs) durante el cual se utilizarían las enzimas presentes en las células crecidas en ausencia de luz (Brawerman & Chargaff, 1958; Brawerman et al, 1962; Eisenstadt & Brawerman, 1964; Brawerman & Eisenstadt, 1964; Scott & Smillie, 1967; Smillie et al, 1967; Bovannick et al, 1973; Bovanick et al, 1974).

Otra aproximación al estudio de estos fenómenos implica la preparación de anticuerpos (Ac) para las proteínas de los cloroplastos maduros, inyectando polvos cetónicos de cloroplastos purificados a ratones y aislando el antisuero. Luego es posible detectar el número de reacciones Ag-Ac, por los métodos comunes de difusión en ágar, desarrollados por Ouchterlony.

Empleando estos métodos se pudo demostrar que hay un aumento progresivo en el número de antígenos (Ag) en la célula, que reaccionan con los Ab anticloroplastos, a medida que avanza su desarrollo. Esto sugiere, evidentemente, que se están sintetizando nuevas proteínas durante el proceso (Lewis et al, 1965).

Recordemos que Wilden y Hauska (1974) demostraron empleando esta técnica la localización del sitio de reacción del citocromo 552 en cloroplastos de E. gracilis.

Consideradas en conjunto, estas evidencias indican que la inducción por la luz del desarrollo cloroplástico, se asemeja a una inducción masiva de enzimas adaptativas. Durante este proceso aparecen varias proteínas nuevas y actividades enzimáticas, y teniendo en cuenta que esto ocurre en un medio que no contiene fuentes de carbono y nitrógeno, estas moléculas deben ser sintetizadas a partir de pools internos de intermediarios o a partir de la ruptura de macromoléculas existentes.

A la misma conclusión llegaron Bowarnick et al (1974), considerando que durante el proceso del desarrollo cloroplástico, ocurría probablemente un recambio proteico, ya que el contenido de proteínas celulares totales no se mo-

dificaba significativamente.

XI.2.4. RNA y ribosomas:

Varios trabajos, empleando E. gracilis Z, han demostrado que la exposición a la luz de organismos crecidos en la oscuridad induce no sólo la síntesis de proteínas cloroplásticas, sino también un aumento y cambio en el RNA celular (Smillie y Krotkov, 1960; Brawerman et al, 1962; Pogo et al, 1962; Brown y Haselkom, 1971). Por estudios posteriores se comprobó que los cloroplastos tenían ribosomas diferentes (Braweman, 1963) que podían distinguirse de los citoplasmáticos, por la composición de sus bases y las características de sedimentación (Eisenstadt y Browerman, 1964; Brawerman & Eisenstadt, 1964).

Eisenstadt y Brawerman (1963) demostraron que cloroplastos intactos de Euglena pueden incorporar aminoácidos en las proteínas; posteriormente estos mismos autores (1964 a, b) reportaron que ribosomas aislados de cloroplastos y citoplasma podían incorporar aminoácidos en las proteínas, si se les provee de los cofactores e intermediarios necesarios.

En 1962 Barnett et al (1969) observaron que la exposición a la luz de células de E. gracilis crecidas en oscuridad, induce la síntesis de, por lo menos, 3 nuevas especies de tRNA. En estudios paralelos con una mutante blanqueada demostraron que la inducción depc día de la habilid de las células para formar cloroplastos y descartaron la posibilidad que las nuevas especies de t-RNA fueran el resultado de algún efecto de la luz sobre el mismo t-RNA. Las evidencias sugieren que tanto los cloroplastos como el citoplasma de Euglena, tienen sistemas sintetizantes de proteínas de un tipo similar al encontrado en otros sistemas.

XI.2.5. DNA:

La presencia de DNA en los cloroplastos de E. gracilis ha sido firmemente establecida por varios trabajos (Edelman et al, 1964; Schiff y Epstein, 1965; Kirk, 1966).

En cambio, en las mutantes citoplasmáticas de Euglena, incapaces de formar cloroplastos, no se ha observado la presencia de DNA (Edelman et al, 1964; Ray & Hanawalt, 1965; Edelman et al, 1965).

En 1967, Scott & Smillie demostraron, por medio de la formación de diferentes especies híbridas DNA-RNA, que el DNA cloroplástico codifica para el RNA de los ribosomas de los cloroplastos.

XI.2.6. Lípidos:

Se han encontraro diferencias en el contenido y clase de lípidos en células crecidas en presencia o ausencia de luz (Rosenberg, 1963).

Como ya lo hemos mencionado, el ácido α-linolénico es un componente característico de los cloroplastos de Euglena;ya que se encuentra presente en células

verdes, pero está ausente o sólo presente en muy pequeñas cantidades, en células que no forman estructuras plástidas (Enwin & Bloch, 1962).

El ergosterol, sin embargo, no aparece estar asociado al cloroplasto, ya que se encuentra en cantidades comparables en células crecidas en presencia o ausencia de luz y en mutantes (Stern et al, 1960).

XI.3. RETORNO DEL CLOROPLASTO A LA CONDICION DE PROPLASTIDO:

Los cloroplastos de Euglena son capaces de retornar a la condición de proplástido, por re-adaptación al crecimiento en oscuridad (Ben-Shaul et al, 1965). En células en división, las lamelas se disocian en discos, que se pierden progresivamente a partir del plástido, a una velocidad de aproximadamente 0,3 por generación (velocidad algo menor que la predicha a partir de una simple dilución de los constituyentes cloroplásticos entre las células hijas, 0,5 por generación); la clorofila, sin embargo, desaparece, inicialmente, a una velocidad de 0,5 por generación; lo cual sugiere que, cuando se retira la fuente de luz, la síntesis de clorofila cesa inmediatamente, pero la formación de discos y lamelas puede continuar aunque a velocidades muy bajas.

Esta evidencia lleva a la conclusión que la síntesis del RNA mensajero para la síntesis de los constituyentes cloroplásticos, puede estar reprimida en la oscuridad; pero que el mensajero presente tiene un tiempo de vida suficientemente largo como para persistir por una o dos generaciones y permite la síntesis de dichos constituyentes, a una velocidad menor, a medida que el RNA mensajero disponible se diluye entre las células hijas.

Luego de 144 hrs de oscuridad (aproximadamente 8 generaciones) el cloroplasto regresa totalmente a la condición de proplástido (Ben-Shaul et al, 1965).

Se presenta una situación diferente si las condiciones experimentales son tales que las células no se dividen (Ben-Shaul et al, 1965). Prácticamente, no hay pérdida de la estructura cloroplástica, durante las primeras 144 horas, a pesar que ya se ha perdido totalmente un 38% de la clorofila y un 50% se ha convertido en feofitina (Brown, 1963).

Esto sugiere que la clorofila por sí misma, no es un determinante de la estructura lamelar; conclusión a la cual han llegado varios investigadores trabajando con diferentes materiales (Von Wettstein, 1961).

Por lo tanto, el desarrollo cloroplástico, inducido por la luz, a partir del proplástido, tiene lugar tanto en células en división como en reposo, en forma similar; en cambio, el proceso inverso, o sea la transformación del cloroplasto en proplástido, en ausencia de luz, sólo se produce en células en división.

Una posible explicación de estas diferencias se puede encontrar en los mecanismos de control que permiten que Euglena se adapte a su situación ecológica. Como ya sabemos, este organismo es un fotótrofo u organotrofo facultativo, que crece igualmente bien, fijando CO_2 fotosintéticamente o a expensas de compuestos orgánicos reducidos del medio.

Los organismos crecidos en ausencia de luz y que contienen sólo proplástidos, pueden vivir y multiplicarse, si tienen disponible una fuente reducida de carbono. Si ésta no es la situación, dichos organismos no se dividen más pero pueden seguir viviendo mientras los nutrientes del medio lo permitan. Evidentemente, es una gran ventaja adaptativa para el organismo, en estas condiciones, que sea capaz de formar cloroplastos, inmediatamente que se lo expone a la luz y adoptar así, un modo fototrófico de existencia.

Aun en presencia de compuestos orgánicos, cuando el organismo puede dividirse, la fotosíntesis puede ser un método más eficiente de utilización de la energía. Así, el organismo es capaz de formar cloroplastos en ambas condiciones, de división y de reposo.

Consideremos ahora el organismo con cloroplastos totalmente desarrollados, y se le retira la fuente de energía luminosa, se pueden presentar, entonces, dos alternativas:

i) si el medio no contiene una fuente reducida de carbono y por lo tanto, cesa el crecimiento en la oscuridad, las células conservan sus plástidos; esto representaría una ventaja cuando se exponga nuevamente a la luz.

ii) si, por el contrario, en el medio se encuentran presentes compuestos orgánicos reducidos, el organismo se divide y pierde rápidamente los cloroplastos, los cuales regresan a su condición de proplástido y sigue viviendo perfectamente bien como un organismo organotrofo.

Evidentemente, durante la evolución, los mecanismos de control han sido bien seleccionados en E. gracilis, ya que le permiten adaptarse eficientemente a las distintas condiciones ambientales a las que pueda ser sometida.

XI.4. REPLICACION

XI.4.1. Evidencias citológicas de la división de los cloroplastos:

Trabajos pioneros de Godjics (1934) demostraron, en E. deses, que la célula se divide primero, aportando el complemento cloroplástico en forma equivalente a cada una de las células hijas.

Una vez que se produjo la división celular, cada cloroplasto se divide para reponer el complemento plástido original.

Puesto que en este organismo los cloroplastos retornan a su condición de proplástidos, cuyo número permanece aproximadamente constante de generación en generación, en la oscuridad; y considerando que células crecidas en esas condiciones, son capaces de formar cloroplastos, parece razonable asumir, que los proplástidos, en las distintas especies de Euglena, también son capaces de dividirse.

XI.4.2. Bloqueo de la habilidad de formación de colonias verdes por luz U.V.

Si células de E. gracilis, crecidas en presencia o ausencia de luz, se expo

nen a la luz U.V., y luego son plaqueadas bajo condiciones no-reactivantes, pero con una intensidad luminosa como para inducir la formación de cloroplastos, el número de colonias verdes disminuye a medida que aumenta la dosis de luz U.V. (Pringsheim, 1958; Lyman et al, 1959; 1961).

Así se puede observar que un número creciente de colonias blancas van reemplazando las colonias verdes existentes; por lo tanto, la luz U.V. ha ocasionado la pérdida de la capacidad de enverdecimiento, en la progenie de células que ha recibido la radiación.

Es posible lograr un 100% de conversión de la progenia a dichas condiciones, empleando dosis de luz U.V. que son lo suficientemente bajas como para no tener efecto alguno sobre la viabilidad celular; la pérdida de ésta comienza a dosis 10 veces mayor que la máxima requerida para la inactivación de la capacidad de formación de colonias verdes (Lyman et al, 1961; Edelman et al, 1964; Hill et al, 1966 b).

Debemos tener presente que este fenómeno ocurre tanto en células crecidas en presencia de luz (contienen cloroplastos), como en células crecidas en la oscuridad (no tienen cloroplastos); esto nos demuestra que la presencia de cloroplastos, en el momento de la irradiación, no es necesaria para que se produzca la inactivación.

Puesto que la sensibilidad de la formación de cloroplastos a la luz U.V. es aproximadamente el doble en células crecidas en la oscuridad que en células crecidas en la luz, Lyman et al (1961) adoptaron, desde el comienzo de sus trabajos, la hipótesis que las entidades sensibles a la luz U.V., eran incorporadas en los cloroplastos durante su desarrollo y que, por lo tanto eran citoplasmáticas, esto se apoyaba en principio, en la ausencia de letalidad en el rango de dosis usadas.

La primera pregunta que surgió entonces, estaba referida al número de entidades sensibles al U.V. que controlaban este proceso. Un análisis de las curvas de inactivación (basado en la "tangent theory") reveló que para ambos casos, células verdes y etioladas, las curvas se ajustaban a multiplicidades de aproximadamente 30 (Lyman et al, 1961); lo cual fue luego verificado por análisis de computación de varios experimentos (Hill et al, 1966 a y b).

Este número coincidía muy bien con el número de proplástidos, en células crecidas en la oscuridad, estimado por microscopía de fluorescencia. El hecho de que células crecidas en la luz conteniendo 10 cloroplastos, también presenten "multiplicidades ultravioletas" de 30, llevó a que Lyman et al (1961) postularan que en la formación de 10 cloroplastos a partir de 30 proplástidos, durante el desarrollo inducido por la luz, los proplástidos se fusionaran en grupos de 3 para formar un único cloroplasto que conservaba las 3 entidades sensibles presentes en cada proplástido. Este hecho, por supuesto apoyaba su hipótesis de trabajo.

Gibor y Granick (1962) confirmaron estas ideas empleando un microrrayo de

luz U.V., con el cual demostraron que, irradiando selectivamente el núcleo, con altas dosis de luz U.V., obtenían un 100% de letalidad; mientras que dosis bajas,dirigidas al citoplasma, con el núcleo protegido, lograban reproducir el fenómeno descripto.

Por lo tanto, hasta el momento, las evidencias experimentales obtenidas, indicaban que las entidades sensibles a la luz U.V., estaban localizadas en los mismos plástidos.

El segundo interrogante se planteaba con respecto a la naturaleza química del cromóforo sensible al U.V. El espectro de acción para la inactivación ultravioleta reveló que el cromóforo tenía picos en las regiones de 260 y 280 mu, sugiriendo la participación de una nucleoproteína (Lyman et al, 1961).

Schiff et al (1961 a) demostraron que, como ocurre en otros sistemas, la inactivación de lahabilidad de formar colonicas verdes en Euglena, puede revertirse por tratamiento con luz U.V. de longitud de onda larga y luz azul, aplicado inmediatamente después de la irradiación inactivante. La eficiencia de este proceso de fotoactivación por efecto de luz visible puede llegar a ser de un 100%; esta es una eficiencia muy alta si se la compara con la de otros sistemas y con la fotoactivación de la viabilidad en Euglena misma (Hill et al, 1966 b).

Schiff et al (1961 a) demostraron que las células se dividen luego del tratamiento con luz U.V., la fotoreactivación se pierde rápidamente; la cinética de esta pérdida es consistente con la hipótesis de que la luz U.V. previene la replicación de las entidades responsables de la formación del cloroplasto y, por lo tanto, se diluyen entre la progenie. En células que no se dividen no se observa decaimiento de la fotorreactivilidad. El espectro de acción para la fotorreactivación de la formación del cloroplasto presenta una sola banda en la región del U.V. cercano y del azul; mientras que el proceso de formación de los cloroplastos inducido por la luz presenta un espectro de acción con picos en las regiones azul y roja del mismo. Estas diferencias son de gran utilidad pues permiten la separación experimental de ambos procesos; así puede inducirse selectivamente el desarrollo cloroplástico por irradiación con luz roja sin que se produzca paralelamente una fotorreactivación (Schiff et al, 1961 a).

Los autores concluyen que las evidencias presentadas son consistentes con la hipótesis de la existencia de entidades citoplasmáticas, que se replicarían durante la división celular y controlarían la formación del cloroplasto.

Además, el espectro de acción para la fotorreactivación en Euglena es muy similar a los descriptos para la fotorreactivación de la viabilidad de E. coli y la fotoreactivación del bacteriófago T_2, inactivado con luz U.V., en el mismo organismo. Puesto que se sabe que este proceso involucra la inactivación y reparación del DNA, se puede considerar la posibilidad de que nucleoproteínas localizadas en el DNA plástido controlen la habilidad de las células para producir colonias verdes.

Inmediatamente, adquirió importancia un nuevo par de interrogantes, si la luz U.V. actuaba previniendo o inhibiendo la replicación de las entidades plástidas o si, simplemente, interfería en el desarrollo de proplástidos a cloroplastos.

Los trabajos de Shiff et al (1961 b) colaboraron, en parte, a esclarecerlo. Irradiaron células crecidas en la oscuridad con una dosis de luz U.V. capaz de producir un 100% de inactivación de la capacidad de formación de colonias verdes, cuando dichas células eran plaqueadas bajo condiciones no-fotorreactivantes. Luego, tomaban una alícuota de estas células y la transferían a un medio de mantenimiento, en el cual las células no se dividían, exponiéndolas a la luz roja, que, como ya dijimos, induce la formación de cloroplastos y clorofila, sin producir fotorreactivación.

La microscopía de fluorescencia reveló que todas las células irradiadas formaban cloroplastos y sintetizaban clorofila, lo cual indicaba que el desarrollo del cloroplasto no era bloqueado por luz U.V. Sin embargo, cuando las células que habían formado sus cloroplastos, fueron plaqueadas en un nuevo medio de crecimiento, se observó un 100% de colonias blancas, lo cual sugería que la luz U.V. bloqueaba la replicación de las entidades responsables de la formación de cloroplastos, en el momento de la división celular.

Los experimentos de inactivación con luz U.V. y de fotorreactivación realizados hasta el momento, llevaron a la suposición de que las células crecidas en la oscuridad, contienen aproximadamente 30 entidades DNA-proteína localizadas en 30 proplástidos.

La luz induciría la formación de 10 cloroplastos, cada uno constituído por la fusión de 3 proplástidos; conservándose las 30 entidades DNA-proteína en cada célula, pero que estarían ahora localizadas a razón de 3 por cloroplasto.

La irradiación con luz U.V. de ambos tipos de células, crecidas a la luz o en oscuridad, daría como resultado un bloqueo en la división del cloroplasto o proplástido, respectivamente, durante la división celular.

Esto predice, entonces, que la inactivación por luz U.V. y la pérdida de la capacidad de enverdecimiento por una célula serían sinónimo de la pérdida de los plástidos celulares y de sus entidades DNA.

Sin embargo, según Brawerman (1968) la extrema sensibilidad de la replicación del DNA cloroplástico frente a una variedad de agentes, no sólo la luz U.V. sino otros como estreptomicina, temperaturas elevadas, etc., no puede ser totalmente explicada en términos de sus propiedades bioquímicas.

El DNA cloroplástico es rico en tiamina y, por lo tanto, es susceptible a la formación de dímeros de esta base por irradiación con luz U.V.; además, debido a su bajo contenido de grupos G-C tiene una temperatura de desnaturalización relativamente baja. No obstante, Brawerman (1968), duda que estas propiedades puedan explicar la sensibilidad del sistema de replicación cloroplás

tico, a una temperatura ligeramente elevada, como es 3[illegible] C, y dosis relativamente bajas de luz U.V.

Dicha sensibilidad podría radicar en su grado bajo de metilación comparado con el DNA nuclear, aunque esto no está totalmente esclarecido.

También es probable que la sensibilidad del DNA cloroplástico esté determinado, ya sea por una configuración especial o por alguna propiedad particular de la DNA-polimerasa (Brawerman, 1968).

Cook, en 1972, reportó que diferencias en las condiciones de crecimiento del cultivo, fundamentalmente la intensidad de la luz a la que estaba expuesto, antes de recibir la irradiación ultravioleta, tenía un significativo efecto sobre el número de inactivación o "target" para el blanqueamiento de Euglena. Este hecho brindaba así, una posible explicación para algunas discrepancias encontradas en la literatura con respecto a los mismos. Por ejemplo, Petrópolus (1964) había reportado valores de 60; mientras que Brodie et al (1965), usando una aproximación teórica, estimó que debería ser aproximadamente 80; en cambio Hill et al, 1966, como ya hemos comentado, reportó que Euglena contenía alrededor de 30 a 40 sitios sensibles al U.V.

Por otro lado, Epstein y Allaway (1967) habían encontrado que los números "target", para la inactivación por luz U.V. de la replicación plástica, en Euglena eran directamente proporcionales al DNA celular total, cuando este último estaba reducido por cultivo en un medio con nutrientes limitantes (fostato o sulfato); lo cual sugería además que el nivel del DNA plástido total era proporcional al contenido total de DNA celular.

Cook (1972) también encontró que los niveles de DNA celular en E. gracilis Z aumentaban sólo ligeramente por acción de la luz visible, aproximadamente un 25%; pero, este aumento no era proporcional a la intensidad de luz, por lo menos, en el rango que empleó para iluminar los cultivos, 150-1200 ft-cd.

Además, los números de extrapolación para la inactivación por U.V. de la replicación plástida (obtenidos a partir de las curvas de inactivación) tampoco eran proporcionales al contenido total de DNA. Dichos números eran, por lo menos, 3 veces mayores para células crecidas en la luz (150) que para células crecidas en la oscuridad (45); en el primer caso no variaba si las células habían sido iluminadas con luz de 700 ó 1200 ft-cd.

Si se supone que la luz U.V. daña únicamente al DNA plastido, entonces los plástidos de células crecidas a la luz deberían contener, por lo menos, 3 veces más DNA que las células crecidas en la oscuridad; hecho que no fue encontrado por Cook (1972). Por lo tanto, la proporcionalidad reportada por Epstein y Allaway (1967), no se mantendría en todas las condiciones de cultivo.

Por otro lado, Cook (1972) señala que, cuando empleaba condiciones de cultivo similares a las usadas por los otros autores (Epstein y Schiff, 1961; Hill et al, 1966) obtenía números de extrapolación aproximadamente iguales; evidentemente las diferencias se debían a las distintas condiciones experimentales utilizadas.

Cook (1972) también comenta que las bajas intensidades de luz empleadas por estos autores (100-150 ft-cd), son adecuadas para el desarrollo del cloroplasto, pero son significativamente más bajas que los niveles mínimos requeridos para un crecimiento fototrófico óptimo (Cook, 1963) y por lo tanto, pueden estar muy por debajo de los niveles óptimos para el desarrollo completo del DNA plástido. De todos modos, Cook (1972) concuerda con Brody (1968) en que el valor de extrapolación de 30-40 reportado por ese grupo de investigadores representaría el límite inferior para los números de extrapolación o inactivación (durante un crecimiento no-limitado).

El DNA plástido sería, de cualquier forma, el primer "blanco" de la acción de la luz U.V.; sin dejar de lado que puedan estar involucrados otros mecanismos.

XI.4.3. El DNA de los cloroplastos y otras organelas

Los experimentos con luz U.V. contribuyeron sin duda a confirmar la presencia en Euglena de especies de DNA localizadas en los plástidos.

Otras evidencias que apoyan su existencia surgieron del análisis de las bandas obtenidas por pasaje del DNA de Euglena por un gradiente de cloruro de cesio (Leff et al, 1963).

Las células crecidas en la luz presentaban 2 bandas de diferente intensidad, una a a,708 y una banda satélite a 1,688; ambas de doble cadena puesto que la desnaturalización por calor producía el esperado desplazamiento de las mismas a valores mayores de densidad.

Las preparaciones de DNA correspondientes a mutantes ultravioletas que han perdido totalmente sus estructuras plásticas, retenían la banda principal a una densidad de 1,708, pero no mostraban la banda satélite; esto sugería que la banda principal (1,708) era probablemente la correspondiente al DNA nuclear; mientras que la banda satélite sería la correspondiente al DNA cloroplástico. Además las células etioladas, que contenían proplástidos, también presentaban la banda a 1,688 (Edelman et al, 1964).

Posteriormente se demostró que la banda satélite estaba altamente enriquecida en la fracción cloroplástica de E. gracilis var. bacillaris y de E. gracilis Z (Edelman et al, 1964; Ray & Hanawalt, 1964; Brawerman & Eisenstadt 1964 b)

Posteriormente, empleando mayor cantidad de DNA, se demostró que en ambos tipos de células, crecidas a la luz u oscuridad, la banda satélite consistía, en realidad, de 2 DNA satélites. Uno a 1,688 y otro de densidad 1,691, correspondiente al DNA mitocondrial (Edelman et al, 1965; Ray & Hanawalt, 1965).

XI.4.4. Ultraestructura de células irradiadas con luz U.V.

Las células mutadas con luz U.V. incapaces de formar cloroplastos y de sintetizar clorofila, nunca regresan a su estado original; además la microscopía de fluorescencia revela que no se encuentran presentes estructuras fluorescentes de ningún tipo, indicando la ausencia de protoclorofila (ida).

Por medio de la microscopía electrónica se puede confirmar la ausencia total de cloroplastos o proplástidos, según sean mutantes que provengan de células crecidas en presencia o ausencia de luz respectivamente, obtenidas por tratamiento con luz U.V., estreptomicina o temperaturas elevadas (Liss et al, 1965).

También se pueden aislar mutantes las cuales no han perdido totalmente la capacidad de formar cloroplastos, sino que presentan un bloqueo en un determinado paso del desarrollo. Estas presentan o forman poplástidos cuando crecen en la oscuridad pero exhiben anormalidades muy interesantes que pueden llegar a ser de suma utilidad en el estudio de las fases fisiológicas del desarrollo, (Liss et al, 1965). Las células mutadas muestran un fenómeno también observado en células crecidas en ausencia de luz (Lefort, 1964): una gran hipertrofia de las estructuras mitocondriales de una amplia y extraña diversidad. Este hecho es bastante lógico, por cierto, ya que es muy probable que la presencia o ausencia de cloroplastos activos, controle el desarrollo de las estructuras mitocondriales, con el fin de mantener una actividad respiratoria compensada. No obstante, no debe olvidarse la posibilidad de que el agente mutagénico empleado en cada caso para producir mutaciones en el fenotipo cloroplástico, también tenga efecto sobre el DNA mitocondrial, ocasionando mutaciones que finalmente darán lugar a formas anómalas de estas organelas.

Michaelis y Gibor (1973) reportaron que la observación por microscopía electrónica de células de E. gracilis que habían recibido una dosis blanqueante de luz U.V. indicaba que había una continuidad de la estructura plástica durante 5 generaciones. Según los autores parecería haber una continua dilición de los tilacoides plástidos y una disminución en el tamaño de los plástidos, en las células blanqueadas. Están de acuerdo o coinciden con las observaciones de Lefort (1964), en que también las mitocondrias serían afectadas por la irradiación U.V., ocurriendo un cambio en la posición de los pláticos en relación a las mitocondrias, puesto que en las células normales verdes los cloroplastos ocupan la región perisférica y las mitocondrias se encuentran en el interior de las células. Luego de la irradiación, con la proliferación de la mitocondria y la degeneración de los cloroplastos, las posiciones relativas de estas organelas se modifican; ahora la mitocondria ocupa la posición perisférica en lugar de los plástidos.

Schiff y sus colaboradores (Schiff y Epstein, 1965, 1968; Schiff y Zeldin, 1968) tampoco observaron, en varias generaciones luego de la irradiación U.V., estructuras plástidas; no obstante ellos indicaron la presencia de algunas estructuras semejantes a proplástidos.

Michaelis y Gibor (1973) consideran que esas estructuras no identificadas eran plástidos o fracciones de los mismos remanentes, debido a que en su material de trabajo también observaron algunos cuerpos similares a proplástidos que se formaban a partir de los cloroplastos en degeneración.

Otros autores reportaron los mismos resultados trabajando con células de

Euglena blanqueadas con estreptomicina (Ophir y Ben-Shaul, 1968; Ben-Shaul, Silman y Ophir, 1972). Por lo tanto, Michaelis y Gibor (1973) sugieren que el proceso de degeneración de los plástidos, luego de irradiación con luz U.V. es similar al proceso de retorno de los cloroplastos al estado de proplástidos, cuando las células son colocadas en la oscuridad (Ben-Shaul, Epstein y Schiff, 1965). Las velocidades de pérdida de las lamelas en células verdes crecidas en la oscuridad era, en ese estudio, de 0,3 lamelas/generación; en el estudio de Michaelis y Gibor (1973) era de 0,4/generación, siendo estas dos velocidades menores que la pérdida esperada de 0,5/generación de acuerdo con la hipótesis de dilución.

En 1974, Kivie y Vesk reportaron que de 18 cepas de E. gracilis Z blanqueada por diferentes métodos (luz U.V., piribenzamina, estreptomicina, temperaturas elevadas y presión hidrostática) sólo en tres de ellas no lograron detectar por microscopía electrónica la presencia de estructuras tipo proplástidos, o sea cuerpos pequeños que, en mayor o menor grado se asemejaban a ellos en su tamaño, estructura y grado de complejidad, lo cual variaba según la cepa.

Las tres cepas en las cuales no encontraron dichas organeles eran: la Sm-V (blanqueada con estreptomicina); PR-4 (blanqueada por presión hidrostática) y la PBZ-G4 (blanqueadas con piribenzamina), todas derivadas de la cepa E. gracilis Z y aisladas por Vavra (1956) la primera y por Gross (1965) las dos últimas. Observaron, además que las cepas aplastídicas sintetizaban carotenoides, pero en menor grado que las otras cepas blanqueadas y que, independientemente de la presencia o no de plástidos, no había clorofila (o ida) detectable en ninguno de los distintos stocks examinados.

XI.4.5. Segregación somática y velocidad de enverdecimiento luego de la irradiación con luz U.V.

Varios métodos pueden permitir la obtención de prácticamente el 100% de clones blanqueados permanentemente, a partir de Euglena verde o etiolada (Lyman et al, 1961; Uzzo y Lyman, 1971; Ebringer, 1972).

Se considera generalmente que las mutaciones producidas en el genoma plástido son las responsables de estos efectos; la prueba más importante deriva del hecho de que si se irradia sólo el núcleo no se obtienen mutantes blanqueadas y sí aparecen luego de la irradiación del citoplasma (Gibor y Granick, 1962 b). Algunos autores han descripto cierta "inestabilidad genética" luego del tratamiento mutagénico, puesto que las células tratadas y su progenie daban origen a células verdes y blancas simultáneamente (Lyman et al, 1961; Gibor y Granick, 1962 a; Grenson, 1964).

En 1977, Nicolas et al, realizaron un cuidadoso y exhaustivo estudio sobre el tema, empleando E. gracilis Z crecida en presencia y ausencia de luz, irradiada con luz U.V. El examen cuantitativo de la segregación somática les ofrecía pruebas adicionales de que la formación del cloroplasto está controlada por unidades extranucleares, sometidas a segregación somática y un estudio

cuantitativo de la velocidad de enverdecimiento les indicaría que es muy probable que aparezcan formas intermedias entre las células típicamente verdes y las células típicamente blancas. Estos autores entonces, definieron primero los diferentes parámetros que pueden caracterizar el comportamiento genético de las células irradiadas (proporciones de segregación, velocidad de enverdecimiento, sensibilidad de estos parámetros a la velocidad de multiplicación) y luego trataron de correlacionarlos introduciéndolos en un modelo determinado. Las conclusiones obtenidas por Nicolas et al (1977) fueron:

i) durante la multiplicación de células irradiadas puede tener lugar una segregación entre las células blanqueadas (cuya progenie es incapaz de enverdecer) y células verdes. Algunas de las células verdes dan progenies formadas exclusivamente por células verdes; la progenie de otras, en cambio, está compuesta parcialmente por células blanqueadas;

ii) si se supone que el enverdecimiento es un resultado de la actividad de unidades funcionales dotadas de continuidad genética ("Plastidial Segregating Units": PSU), la segregación de esas unidades parecería ocurrir según un modelo de división al azar, duante las primeras tres divisiones; durante las siguientes, las unidades funcionales parecerían multiplicarse más rápido que aquellas dañadas por la irradiación;

iii) la velocidad de enverdecimiento de colonias provenientes de células irradiadas parecería estar condicionada principalmente, por el número de "PSU" funcionales remanentes en la célula madre de la colonia.

XI.5. POSIBLES MECANISMOS DE CONTROL PARA EL DESARROLLO Y REPLICACION DEL CLOROPLASTO.

Schiff & Epstein (1968) han ideado un modelo (Figura 58) para relacionar los diferentes y numerosos conocimientos acerca del desarrollo y replicación de los cloroplastos en *Euglena*.

A la izquierda del diagrama han ubicado las células crecidas en la oscuridad que tienen aproximadamente 30 proplástidos, cada uno conteniendo protoclorofila (ida) y DNA. Si estas células se mantienen en esas condiciones, se dividen y los proplástidos se replican para mantener su número constante de generación en generación. Esto implica que el DNA presente en cada proplástido se replica en cada generadión de células, posiblemente por medio de una DNA polimerasa contenida en el mismo plástido.

Los autores consideran que pequeñas cantidades de esta enzima debe estar presente durante el crecimiento en la oscuridad, para permitir la continuidad del proplástido en cultivos crecidos en esas condiciones, hecho que está confirmado experimentalmente.

En la parte derecha de la figura representaron una célula verde o sea crecida en presencia de luz, la cual contiene 10 cloroplastos. De acuerdo con sus resultados experimentales, ya detallados, cada una de estas células contiene tres unidades de DNA, inicialmente presentes en cada proplástido.

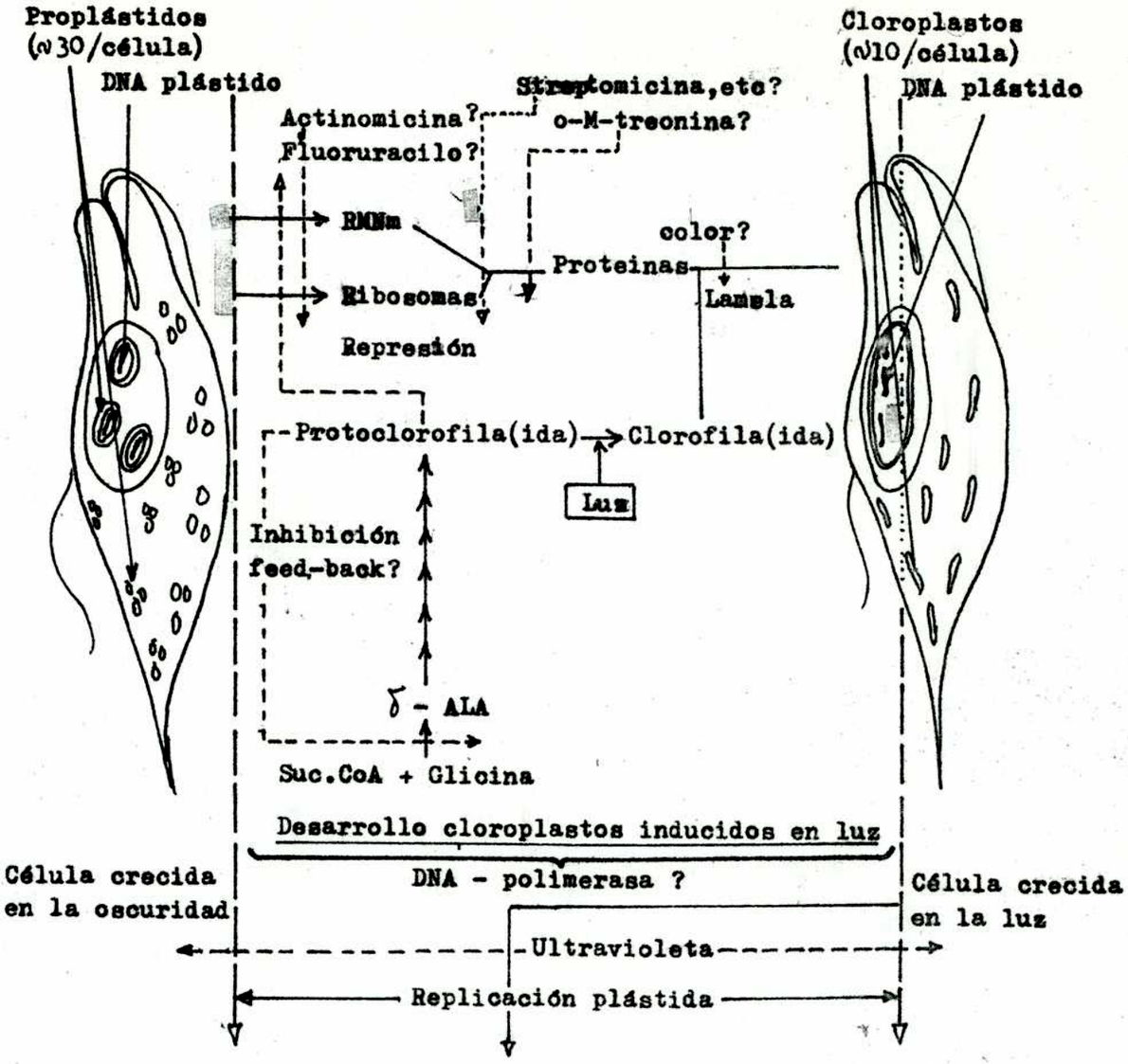


Figura 58: Modelo hipotético para el control del desarrollo y replicación del cloroplasto en *Euglena*.

Cuando el cloroplasto se divide, durante el crecimiento de la célula en la luz, estos DNAs se replican como en las células crecidas en la oscuridad. Teniendo presente que varios trabajos (incluyendo los propios) han demostrado claramente que la luz U.V. bloquea, específicamente, la transmisión de la capacidad de formación de plástidos a las células hijas en el momento de la división celular, los autores han propuesto que el sitio de acción de la luz U.V. es sobre la replicación del DNA.

Consideremos ahora, el proceso de desarrollo desde proplástido a cloroplasto, inducido por la luz. Los proplástidos contienen pequeñas cantidades de protoclorofila (ida) y se sabe perfectamente bien que el espectro de acción para la formación del cloroplasto inducido por la luz, a partir del proplástido, en Euglena y plantas superiores, corresponde al espectro de absorción de la protoclorofila (ida) y que la conversión de este pigmento a la clorofila (ida) en presencia de luz, es un paso necesario en la biosíntesis de la clorofila.

La pequeña cantidad de protoclorofila (ida) presente, (mucho menor de la que se esperaría de un intermediario que se acumula detrás de un bloqueo por la ausencia de luz) sugiere que la formación de protoclorofila en células crecidas en la oscuridad, está bajo control por feedback. Por analogía con otras inhibiciones por feedback, la protoclorofila (ida) podría actuar como inhibidor de la primera enzima de este camino biosintético o sea de la ALA-sintetasa. Además este tipo de regulación para la biosíntesis del hemo ya había sido descripta entre otros, por Burhan y Lascelles (1963).

Pero en la conversión de protoclorofila (ida) a clorofila (ida) en la luz, la concentración (en estado estacionario) del primer pigmento sería lo suficientemente baja como para no seguir ejerciendo la inhibición por feedback sobre la primera enzima de este camino biosintético. Esto sugiere, según los autores, que todas las enzimas que intervienen en la síntesis de protoclorofila (ida) estarían ya presentes en el proplástido y efectivamente, se sabe que células de Euglena mantenidas en la oscuridad, mantienen su contenido de protoclorofila (ida), generación tras generación.

Varios trabajos indican que el comportamiento de este pigmento es consistente con este modelo de inhibición por feedback. Así, la iluminación de células crecidas en la oscuridad, por un cierto período de tiempo, da como resultado, la conversión de toda la protoclorofila (ida) a clorofila (ida); si se las transfiere nuevamente a la oscuridad, estas células resintetizan protoclorofila (ida) hasta que su valor llegue a ser aproximadamente igual al anterior y luego su síntesis cesa. Si se exponen nuevamente a la luz, se volverá a transformar en clorofila (ida); este proceso puede repetirse varias veces, simplemente transfiriendo las células de la luz a la oscuridad y viceversa, reproduciéndose el fenómeno en todos los casos. Esto sugiere que la luz "desbloquea" la síntesis de protoclorofila (ida) convirtiendo la protoclorofila (ida) inhibitoria en clorofila. Luego tiene lugar nuevametne la síntesis de protoclorofila (ida) hasta que se llega al valor oroginal, deteniéndose su biosíntesis una

vez más.

Es importante tener presente que la iluminación de protoclorofila (ida) involucra varios eventos de suma importancia, además de la conversión de este pigmento en clorofila. La luz induce la síntesis de proteínas específicas del cloroplasto y por lo tanto, la de represión del DNA plástido, permitiendo así la síntesis de RNA mensajeros.

Brawerman & Eisenstadt (1964) reportaron la presencia de RNA mensajeros en los cloroplastos de E. gracilis, lo cual encuentra apoyo en los hallazgos de Smillie (1963) y Evans y Smillie (1962) de que el fluoruracilo inhibe el desarrollo cloroplástico si se lo incorpora inmediatamente después de que las células han sido expuestas a la luz. El sistema es insensible al fluoruracilo, si éste se lo agrega 24 horas después de comenzado el desarrollo, indicando que todo el RNA necesario ya ha sido sintetizado durante este período de tiempo.

La actinomicina D es también parcialmente inhibitoria, (Pogo y Pogo, 1964; Mc Calla & Allan, 1964); además según Brawerman (1963) en los cloroplastos de E. gracilis existe un solo tipo de ribosomas; por lo tanto, si el mensajero se sintetiza a partir del DNA plástido, es perfectamente complementario del DNA y se puede asociar a él formando un sistema sintetizante de proteínas.

La hadacidina, un inhibidor de la síntesis de adenina, bloquea el desarrollo cloroplástico, si se la suministra durante las primeras 24 horas del desarrollo cloroplástico (Mego, 1964).

La O-metil treonina bloquea también el desarrollo plástido, quizás por reemplazo de isoleucina, y por lo tanto, formando proteínas que no son útiles o quizás por inhibición de la síntesis de aminoácidos, su efecto es revertido por la isoleucina (Aaronson y Bensky, 1962; Gray y Hendlin, 1962).

Ya hemos comentado detalladamente el efecto de la luz U.V. sobre el desarrollo de los cloroplastos; la Sm da como resultado también un blanqueamiento de las células, pero a diferencia de la luz U.V., según trabajos del grupo de Schiff y Epstein (1968) la Sm bloquearía asimismo el desarrollo cloroplástico, a partir del proplástido.

Las evidencias obtenidas con sistemas bacterianos sugieren que este antibiótico interfiere en la unión del mensajero a los ribosomas, dando como resultado la codificación de ambiguedades (Spotts y Stanier, 1961; Cox et al,1964; Davies et al, 1964). Aplicando este resultado a los cloroplastos de Euglena, se podría suponer, según Schiff & Epstein, que la primera acción de la Sm es bloquear la síntesis de proteínas específicas del cloroplasto en una forma similar a la descripta para bacterias. Si una de las proteínas producidas por este sistema fuese la DNA-polimerasa, para el DNA plástido, entonces la interferencia, con el desarrollo de la Sm se encontraría a nivel de la replicación y, por lo tanto, este antibiótico podría llevar a una eliminación total de las estructuras plástidas y del DNA a partir de las células sometidas a su acción.

Temperaturas por encima de 34°C tienen también un efecto análogo, o sea, pérdida del DNA y estructuras plásticas de las células de Euglena (Pringsheim y Pringsheim, 1952; Brawerman y Chargaff, 1960); es posible, (aunque bastante discutido) que algunas enzimas involucradas en la replicación del DNA plástido sean sensibles a la desnaturalización a esas temperaturas relativamente bajas. Evidentemente, debemos considerar que la inducción cloroplástica por la luz es un tipo coordinado de inducción enzimática que emplea los mecanismos de translación y transcripción, tan complejo como el descripto para otros sistemas.

XII. INHIBIDORES DEL SISTEMA CLOROPLASTICO

XII.1. INTRODUCCION

Existe un número creciente de agentes físicos y químicos que temporaria o permanentemente, producen la pérdida de los cloroplastos en Euglena. Esta sensibilidad a los factores ambientales, los cuales tienen poco o ningún efecto sobre el resto de la célula, enfatiza la naturaleza semiautónoma de estas organelas.

La presencia de DNA y de un sistema sintetizante de proteínas, sugiere que los cloroplastos deben ser entidades semi-independientes que proveen a la célula de un mecanismo para convertir luz en energía química. Los cloroplastos de Euglena, no obstante, parecen ser más sensibles a los factores ambientales externos que aquellos presentes en otros organismos.

Si Euglena crece en ausencia de luz, en un medio nutriente, pierde rápidamente sus cloroplastos y se vuelve de color blanco amarillento. Cuando estas células se exponen a la luz, en un medio que contiene fosfato y magnesio, comienza la formación del cloroplasto, en ausencia de división celular y a expensas de las proteínas celulares.

Como ya lo hemos descripto, no hay replicación de los plástidos bajo estas condiciones; la protoclorofila se convierte en clorofila; se forman nuevos ribosomas; se induce la síntesis proteica y se forma el cloroplasto.

Durante la división celular, en presencia o ausencia de luz, sí tiene lugar la replicación de los plástidos.

Los agentes que afectan los cloroplastos de Euglena se pueden dividir en dos categorías generales: aquellos que producen una pérdida permanente de la capacidad de formación de los plástidos por un proceso de dilución durante la división celular; y aquellos que interfieren temporariamente con la formación del cloroplasto en la luz.

Los agentes "blanqueantes" son generalmente efectivos durante la división celular y provocan la pérdida permanente de los cloroplastos de la célula.

La inhibición de la formación del plástido es, en cambio, reversible; los inhibidores interfieren temporariamente con la conversión de los proplástidos o cloroplastos verdes o pueden producir células blanqueadas reversiblemente en un cultivo en crecimiento; cuando se remueve la sustancia inhibitoria, se restaura la capacidad para formar cloroplastos. Estos agentes pueden ser inhibidores de la síntesis de clorofila, proteínas o ácidos nucleicos.

XII.2. INHIBIDORES DE LA FORMACION DEL CLOROPLASTO:

XII.2.1 Crecimiento en ausencia de luz:

Las células de Euglena crecidas en la oscuridad, contienen, como ya sabe-

mos, pequeños proplástidos incoloros, en lugar de los grandes cloroplastos verdes presentes en las células crecidas a la luz.

Cuando E. gracilis, crece en ausencia de luz, las lamelas del cloroplasto se desintegran progresivamente y se pierden gradualmente; la clorofila desaparece por dilución.

Se requieren aproximadamente 8 divisiones celulares para una completa conversión de los cloroplastos a proplástidos.

En la oscuridad, el Mg de la clorofila se pierde y aparece la feofitina en la célula.

En células que no están en división no ocurre esta conversión en proplástidos en la oscuridad; Baker (1933) no observó cambios visibles en los cloroplastos de E. gracilis luego de 3 semanas en la oscuridad, en agua destilada.

La transformación de Euglena verde a Euglena irreversiblemente incolora, involucra probablemente, una alteración permanente en alguna estructura "tipo gen" en el cloroplasto. Por lo tanto, el crecimiento en la oscuridad, aun por períodos prolongados, no es de esperar que produzca organismos permanentemente blanqueados.

Así, por ejemplo, Pringsheim (1948), hizo crecer células de E.gracilis en la oscuridad durante un año; y Dubash & Rege (1967) mantuvieron el organismo en ausencia de luz durante 6 años (más de 300 transferencias), sin evidencias de una pérdida permanente de formar cloroplastos.

Grenson (1964) tampoco pudo demostrar pérdida de la capacidad de enverdecimiento por crecimiento de las células en la oscuridad.

Sin embargo, Lwoff & Dusi (1953) reportaron una disminución del número de cloroplastos en E. mesnili, luego de 6 meses en la oscuridad, y luego de 15 meses la mayoría de los organismos tenían 2 cloroplastos y algunos de ellos ninguno.

Wolken (1962) también postuló que la pérdida de los cloroplastos en ausencia de luz no es siempre un proceso completamente reversible.

XII.2.2. Efecto de las condiciones de crecimiento sobre el desarrollo cloroplástico:

La presencia de un sustrato nutriente disponible en el medio de cultivo tiene un efecto sobre la formación de clorofila en células crecidas en oscuridad, cuando luego son expuestas a la luz. La síntesis de clorofila en células etioladas de Euglena, colocadas en presencia de luz, en un medio que no contiene una fuente de carbono, es sólo una tercera parte con respecto a la síntesis de este pigmento, en células bajo idénticas condiciones pero en un medio nutriente complejo (Mego y Buttow, 1966).

App y Jagendorf (1963) encontraron que la naturaleza de la fuente de car-

bono tiene un efecto sobre la síntesis de proteínas y clorofila, en células etioladas. Por ejemplo: la presencia de etanol, reprime la síntesis de clorofila y de la enzima cloroplástica fructosa-1,6 difosfasa.

También se encontró que ocurre una represión, si las células se exponen a la luz en un medio que contiene la misma fuente de carbono que la empleada durante la adaptación a la oscuridad. En estas condiciones, la represión era la misma que se ejercía con etanol; los autores adjudicaron la similitud de estos resultados a un "efecto glucosa", o sea la represión de enzimas inducidas por sustratos.

Grenson (1964), también encontró que la fuente de carbono tiene una significativa influencia sobre la cantidad de clorofila sintetizada en cultivos de Euglena. Un ejemplo excelente de la extrema sensibilidad de los cloroplastos de Euglena a los agentes externos, es el efecto de la concentración de acetato sobre el contenido de clorofila.

Ya nos hemos referido al trabajo de Benton (1967), en el cual encontró que un ligero aumento en la concentración de acetato, producía una disminución muy significativa en el contenido de clorofila de las células, acompañado por un incremento en el contenido de paramilón. Lo importante, es que no observó una represión total de la síntesis de clorofila, sino que el valor máximo obtenido era de un 75%; este resultado indica, evidentemente, la existencia de mecanismos de control celulares que previenen una represión total.

Por otro lado, se deben considerar las variaciones lógicas que ocurren en el contenido de clorofila durante el ciclo normal del crecimiento de Euglena. Así, durante las fases logarítmica tardía y estacionaria temprana, el contenido de clorofila de las células aumenta. Brown (1959) encontró que la intensidad de la luz durante el crecimiento de cultivos de Euglena también producen alteraciones del contenido de clorofila en las células; afectando fundamentalmente, el contenido de clorofila a.

Como ya se ha mencionado la deficiencia de Fe da como resultado un contenido más bajo de clorofila; niveles de Fe que no tienen efecto sobre la velocidad de crecimiento, pueden inhibir la velocidad de síntesis de clorofila en aproximadamente dos tercios de su valor normal (Price & Carell, 1964; Carell & Price, 1965).

Considerando que el Mg es un constituyente de la molécula de clorofila, un medio deficiente en este elemento producirá células con menor contenido de clorifila; pudiendo perderse completamente según las condiciones experimentales. Wolken (1956) observó que los cloroplastos de E. gracilis se colapsan cuando las células crecen en un medio deficiente en Mg. Concluyó o postuló que cualquier agente que destruya la molécula de clorofila, provocará un colapso

de los cloroplastos y desplazamientos espectrales debido a la aparición de "feofitina".

XII.2.3. 5-Fluor uracilo y otros antimetabolitos:

Uno de los primeros eventos que tiene lugar durante el enverdecimiento de células etioladas, de Euglena, es la formación de nuevos ribosomas (Brawerman et al, 1961; Brawerman, 1963). Estos ribosomas están localizados en los plástidos y participan en la síntesis de proteínas cloroplásticas. Por lo tanto, cualquier factor que inhibe la formación de ribosomas o la síntesis de ácidos nucleicos, puede tener un efecto inhibitorio sobre la formación de los cloroplastos en células etioladas expuestas a la luz.

I) Uno de los primeros inhibidores de este tipo que fue reportado es el 5-fluor uracilo (5-FU) (Evans & Smillie, 1962), el cual es un inhibidor efectivo si se lo agrega durante las primeras 20 horas de exposición del cultivo a la luz, pero si se lo agrega pasado este período de tiempo no tiene efecto, a pesar que se sintetiza sólo una parte del contenido total normal de clorofila en la célula.

Su efecto inhibitorio puede revertirse por la adición de una cantidad equimolecular de uracilo, pero no por timina. Smillie et al (1963) demostraron que la velocidad de incorporación de uracilo-2-^{14}C en el RNA ribosomal es inhibida por 5-FU, pero no en el RNA soluble. Interfiere, entonces, en la formación de los ribosomas y por lo tanto, una vez que éstos ya se han formado en los cloroplastos, este compuesto ya no tiene efecto (Aronson, 1961a, b).

No interfiere con la formación de proteínas no-cloroplásticas, las cuales son también inducidas durante la exposición a la luz; por lo tanto, estas proteínas no están sujetas a los mismos controles que las proteínas plástidas.

La síntesis del citocromo 552 es inhibida por 5-FU en el mismo grado que la síntesis de clorofila; sin embargo, la síntesis de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa no sólo no es inhibida, sino que su actividad aumenta y su valor se mantiene elevado por períodos de tiempo más largos que en las células no tratadas.

Evans et al, (1971) confirmaron estos resultados, verificando que si las células son incubadas en la luz con 5-FU, antes de la adición de uracilo, éste no puede ya desplazar al inhibidor. En cambio, la preincubación con 5-FU en la oscuridad, no afecta la reversibilidad por uracilo.

II) Otro inhibidor cuyo efecto ha sido estudiado es el ácido N-Formilhidroxiacético (hadacidina), el cual inhibe el enverdecimiento de células de Euglena, crecidas en la oscuridad, expuestas a la luz (Mego, 1964a).

Este compuesto, análogo estructural del ácido aspártico, previene la sínte

sis de adenina por una inhibición competitiva de la enzima IMP: L-aspartato ligasa (Shigeura y Gordon, 1962); su efecto puede revertirse por agregado de aspartato o adenina en el medio, pero no por uracilo.

En forma análoga al 5-FU, la hadacina, no es efectiva si se la agrega pasadas las primeras 24 horas de iluminación, puesto que el cloroplasto ya tiene formada la mayor parte de la matriz y sólo resta la síntesis de clorofila.

iii) Los inhibidores de la síntesis proteica, como el Cm, también interfieren con el enverdecimiento de células etioladas, expuestas a la luz.

En contraste con el 5-FU, el Cm es efectivo si se lo agrega en cualquier momento durante el proceso de desarrollo del cloroplasto y, aparentemente no interfiere en la formación de los ribosomas (Smillie et al. 1963; Pogo y Pogo, 1965). Este antibiótico inhibe, particularmente, la incorporación de Mg en los componentes lamelares del cloroplasto; como así también la síntesis de clorofila, citocromo b_6 y 552. Las proteínas no-plástidas, como la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, no son inhibidas (Smillie et al, 1963).

El efecto del Cm sobre la síntesis de proteínas en los cloroplastos, tiene lugar a nivel ribosomal.

Anderson & Smillie (1966) demostraron que los ribosomas cloroplásticos de Euglena y plantas superiores, tienen una mayor capacidad para unir antibióticos que los ribosomas citoplasmáticos.

iv) La actinomicina D inhibe la síntesis de proteínas y de RNA, como así también el enverdecimiento (Pogo y Pogo, 1964; Mc Calla y Allan, 1964); sin embargo, la inhibición de la síntesis proteica y de clorofila tiene lugar después de transcurridas 12 horas de la exposición de las células etioladas a la luz.

Este antibiótico inhibe sólo parcialmente la incorporación de uracilo-2-^{14}C en el RNA celular total; por lo tanto como actúa interfiriendo con la síntesis del RNA dependiente de DNA (Hurwitz et al, 1962), estos resultados sugieren que la síntesis de proteínas cloroplásticas deben estar, por lo menos, algunas de ellas, bajo el control del DNA. Sin embargo, considerando que la síntesis de RNA cloroplástico comienza inmediatamente que las células etioladas se han expuesto a la luz (Smillie et al, 1963; Mego, 1964a), uno esperaría que la actinomicina D inhiba completamente el enverdecimiento y la síntesis proteica, salvo o a menos, que la síntesis de RNA-dependiente de DNA, comience, una vez que han pasado las primeras 12 horas de exposición a la luz, cuando la mayoría de los ribosomas ya han sido formados.

v) La hidroxiurea es un conocido inhibidor de la síntesis de DNA en tejidos animales y en bacterias (Rosenkranz & Levy, 1965); actúa inhibiendo la in-

corporación de timidina y fosfato en el DNA de hígado de rata en recuperación (o regeneración). (Schwartz et al, 1965) y de fosfato en el DNA de células tumorales ascíticas (Yarbro et al, 1965); pero no tiene efecto sobre la síntesis de RNA.

Una concentración relativamente elevada, (0,02-0,035 M) disminuye en un 50% la síntesis de clorofila en células etioladas de Euglena expuestas a la luz (Buetow y Mego, 1967); no obstante, concentraciones tan elevadas como 0,2 M aún permiten un cierto grado de enverdecimiento en estas células (aproximadamente un 14% del control).

Si se transfieren a la luz, células de Euglena crecidas en la oscuridad, repicadas a un nuevo medio nutriente que contiene 0,05 M de hidroxiurea, la mayor inhibición se ejerce sobre el DNA celular total (considerando datos por ml); luego le sigue el RNA y la menos afectada es la síntesis de proteínas.

Esto sugiere que el efecto que la droga tiene en Euglena es similar al que ejerce en los tejidos animales; a pesar que su efecto sobre la síntesis de clorofila y formación de los cloroplastos, requiere aún mayor investigación, con el objeto de determinar su efecto y relación con los ácidos nucleicos cloroplásticos.

vi) La actidiona, un inhibidor efectivo de la síntesis proteica a nivel ribosomal (Bennett et al, 1965); previene la incorporación de leucina-^{14}C en las proteínas de Euglena, tanto en luz como en oscuridad (Kirk & Allen, 1966).

Inhibe la síntesis de clorofila, ya sea que se agregue el antibiótico, inmediatamente o luego de 4 a 8 horas de exposición a la luz; 1 ugr/ml produce más de un 90% de inhibición en E. gracilis Z.

La síntesis de carotenoides es también inhibida por la actidiona, aunque no tan eficientemente, como la síntesis de clorofila.

Kirk y Allen (1966) concluyeron, a partir de estos resultados, que la formación de clorofila en Euglena está acompañada de síntesis proteica; quizás la síntesis de la proteína asociada al holocromo de la clorofila. Los carotenoides están menos relacionados a la síntesis proteica durante el enverdecimiento de células etioladas, puesto que también son sintetizados en ausencia de luz, y por lo tanto, las enzimas requeridas para su síntesis ya están presentes en la célula.

El hecho de que los carotenoides sean sólo ligeramente inhibidos luego de 4 horas de enverdecimiento, reafirma esta hipótesis y sugiere que la proteína no es sintetizada durante la formación de estos pigmentos.

vii) Zannotti & Caldi (1963) encontraron que la etionina tiene también un efecto blanqueante, reversible, en E. gracilis, y observaron que este aminoácido análogo de la metionina produce internamente un pliegue o doblez en el DNA

nuclear.

viii) El herbicida 3-amino-1,2,4 triazol también ejerce una acción blanqueante reversible en Euglena (Aaronson & Scher, 1960).

Siegel & Gentile (1966) presentaron evidencias de que este compuesto inhibe la síntesis de histidina, interfiriendo en la acción de la enzima imidazol-glicerol-fosfato deshidrogenasa, en algas.

ix) Cicloheximida: ya nos hemos referido varias veces al efecto que la cicloheximida tiene sobre Euglena.

Enfatizaremos aquí que este antibiótico a bajas concentraciones, no afecta ni el contenido de clorofila ni la habilidad de las células para formar colonias verdes.

Concentraciones elevadas (10-20 ugr/ml) son letales. En células crecidas en la oscuridad expuestas a la luz, en presencia de 8 ugr/ml de cicloheximida, cesa la división celular pero la transformación de proplástidos en cloroplastos es sólo parcialmente afectada.

El enverdecimiento de células etioladas, que no se dividen, y expuestas a la luz, es inhibido en forma proporcional a la concentración de la droga. Con la concentración más alta empleada (20 ugr/ml) las células no sintetizan clorofila y está completamente inhibida la transformación de proplástidos a cloroplastos.

La cicloheximida, evidentemente, afecta los plástidos a través de su efecto sobre el citoplasma y la inhibición de la síntesis de clorofila es debida a la inhibición de la formación de los tilacoides (Ben-Shaul et al, 1970).

x) DCMU: (3(3,4-diclorofenil)-1-1-dimetilurea) es una droga que bloquea la fotosíntesis a nivel del citocromo 552, o sea, inhibe el sistema que lo fotorreduce cuando ha sido oxidado.

Células de Euglena crecidas en un medio autotrófico, a la luz y en presencia de DCMU, muestran una reducción en el número de cloroplastos por célula y profundas alteraciones en la estructura de los remanentes.

Los cloroplastos cambian sus dimensiones y el número de lamelas por cloroplasto; tienden a fusionarse, uno con el otro, formando cloroplastos gigantes y retorcidos.

La intensidad de los cambios morfológicos llega a un máximo luego del quinto día de incubación con la droga. Todos estos cambios son totalmente reversibles y desaparecen 2 ó 3 días luego de la remoción del DCMU.

La reducción en el número de cloroplastos por célula está asociado con la reducción en el DNA cloroplástico (Shmeyour et al, 1969).

En 1976 Calvaynac y Ledoigt estudiaron la evolución de los plástidos bajo diferentes presiones de oxígeno, durante el crecimiento de Euglena en presencia de DCMU. Trabajaron con Euglena gracilis Z, crecida en medio lactato y luz, bajo: condiciones atmosféricas de presión de oxígeno (modalidad A) o presiones de oxígeno bajas (modalidad B). El crecimiento celular fue seguido durante 3 semanas. El contenido de clorofila disminuyó a la mitad en las condiciones A y desapareció totalmente en la B, luego de 10 días.

La cantidad de RNA no varió en A, pero disminuyó y no pudo ser medido hasta después de 12-14 días de crecimiento en las condiciones B.

Las micrografías electrónicas mostraban la aparición de vesículas en los tilacoides cloroplásticos (A) y sólo unos pocos tilacoides intactos se observaron luego de 10 días, cuando se llegó al número máximo de vesículas. En la condición B ocurrió un proceso similar de formación de vesículas, pero más rápido y los cloroplastos desaparecieron. Luego de 10 días sólo se podían ver fantasmas (ghosts) de proplástidos pequeños sin lamelas.

Los autores relacionan la disminución del contenido de clorofila a la formación de vesículas a partir de los tilacoides, en ambas condiciones de crecimiento, y la pérdida de la estructura cloroplástica, en las condiciones de crecimiento B, a la desaparición del RNA ribosomal cloroplástico.

xi) 2,3,5, Triiodobenzoico y Miomicina: El grupo de Fasulo y Vannini (Fasulo et al, 1973; Vannini et al, 1976; Fasulo et al, 1976a; 1977a, b; 1978), han estudiado el efecto de varios inhibidores, como por ejemplo el ácido 2,3,5,triiodobenzoico (TIBA) y un nuevo miembro acuo-soluble, de la familia de los antibióticos básicos del ciclitol, la miomicina, sobre distintos procesos que ocurren en E. gracilis durante su exposición a la luz vinculados al desarrollo de los cloroplastos. Estos autores encontraron que cuando se agrega TIBA a cultivos de E. gracilis etiolada de 3 a 24 horas previas a su iluminación, se inhibe la división celular, la síntesis de clorofila y el desarrollo de los cloroplastos, sugiriendo que su acción se inicia a nivel extraplastídico. También el TIBA induce significativas alteraciones estructurales en E. gracilis, blanqueada temporariamente, que indican que el inhibidor afecta procesos metabólicos que ocurren tanto en el citoplasma como en los plástidos.

La miomicina, inhibió fuertemente la síntesis de clorofila en células en división, no así en reposo. La división celular también se redujo, aunque en menor grado que la formación de clorofila demostrándose por microscopía electrónica, que la disminución en la síntesis del pigmento correspondía a varios estados de inhibición del desarrollo, inducido por la luz, de la estructura de los cloroplastos. Se demostró que todos los cambios fisiológicos y ultraestructurales producidos por miomicina eran idénticos a aquellos, inducidos en E.gracilis por Sm y otros antibióticos aminoglicosídicos blanqueantes; es decir la

acción de este nuevo inhibidor, podría atribuirse a un bloqueo permanente de la síntesis de proteínas en los ribosomas 70S de los plástidos.

XII.3 AGENTES BLANQUEANTES

XII.3.1 Luz ultravioleta:

La acción y los efectos de las radiaciones ultravioletas ya han sido tratadas en el punto XI.4.2.

XII.3.2. Estreptomicina:

El efecto blanqueante que la Sm ejerce sobre Euglena (descripto por primera vez por Provasoli et al, 1948) es más efectivo durante la división celular, especialmente en ausencia de luz, (De Den-Grenson, 1959; Rosen y Gawlik, 1961; Mego y Buetow, 1966); pero se requieren concentraciones relativamente elevadas para producir el mismo efecto cuando la célula está enverdeciendo, en ausencia de división celular.

Células de E. gracilis Z, crecidas en la oscuridad, sintetizan clorofila cuando se las ilumina en un medio conteniendo 5 mgr Sm/ml; concentraciones tan pequeñas como 0,01 mg/ml, pueden inhibir completamente la síntesis de clorofila en la luz, si las células se hacen crecer previamente en la oscuridad, en presencia del antibiótico.

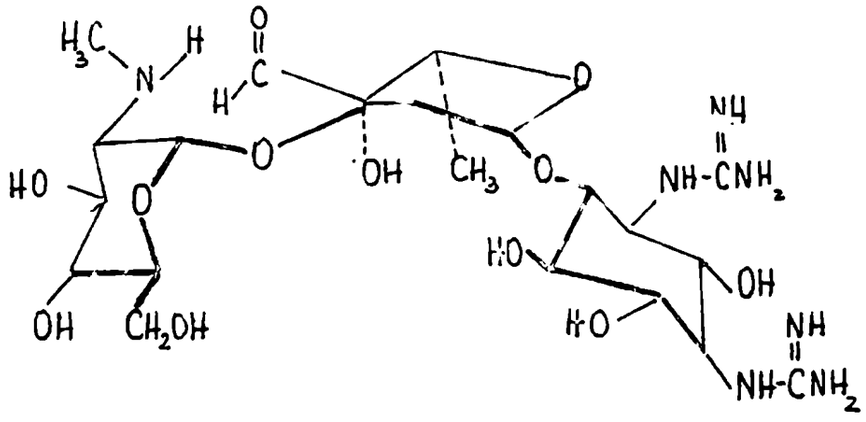
Es importante tener en cuenta que la inhibición que esta droga produce sobre el desarrollo de los cloroplastos, en células etioladas expuestas a la luz, está influenciada por el pH del medio.

Vavra (1957) observó células de E. gracilis durante su crecimiento en un medio con Sm, empleando microscopía de fluorescencia. Encontró que el número de cloroplastos no había disminuído, pero sí su tamaño y el autor explicó esa disminución como una consecuencia de la pérdida de capacidad por parte de los cloroplastos para crecer, y por lo tanto, la división celular reducía su tamaño, hasta que ellos se desintegraban y desaparecían.

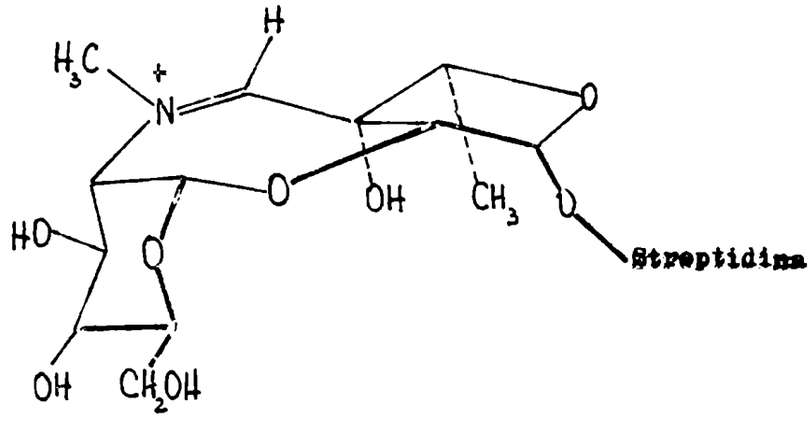
Provasoli et al, (1951) también habían reportado la presencia de cloroplastos más pequeños que los normales, en células blanqueadas con Sm, junto con una pérdida de los pirenoides y finalmente una fragmentación de los mismos; además estos efectos se veían aumentados o acelerados por una rápida división celular.

Algunos autores han reportado la presencia de cuerpos semejantes a proplástidos en células blanqueadas químicamente, por calor o Sm (Siegesmund et al, 1962; Gibor y Granick 1962; Moriber et al. 1963).

Como veremos más adelante, Gibor y Granick (1962) midieron la capacidad de células blanqueadas para sintetizar porfirinas; encontrando que algunas cepas podían producirlas pero otras requerían la presencia del precursor ALA.



Streptomicina



Sal imina cíclica

Figura 59a: DHSM tiene un grupo hidroximetilo en lugar del aldehido y es incapaz de formar la sal cíclica (Aronson et al, 1964)

Siegesmund et al (1962) por el contrario, no lograron detectar la presencia de dichas estructuras similares a proplástidos, en células tratadas con Sm, las cuales habían pasado por varias generaciones y habían sido subcultivadas varias veces en ausencia de luz. Quizás, la presencia o ausencia de proplástidos en células blanqueadas pueda estar relacionado, o sea una función del tiempo o número de generaciones durante las cuales las células se han mantenido en ausencia de luz, en un estado que podemos llamar "aclorofílico" o "sin clorofila"; los plástidos remanentes incapaces de formar cloroplastos pueden quizás, persistir por varias generaciones en Euglena blanqueada.

De-Deken Grenson & Messin (1958) encontraron que los cloroplastos se "diluían" en células de Euglena, durante períodos cortos de división celular en presencia de Sm 0,2%. Algunas células tenían un cloroplasto y otras ninguno luego del período de tratamiento; las primeras recuperaban el número normal de los mismos (8 - 10) cuando se las repicaba a un medio sin el antibiótico; las segundas permanecían blanqueadas.

En otra publicación, De-Deken-Grenson y Godts (1960) no lograron encontrar una relación entre la presencia o ausencia de cloroplastos y la capacidad de la célula para enverdecer, luego de cortos períodos de tratamiento con Sm (1/2 a 2 horas). Las células que eran blanqueadas el final del período del tratamiento podían permitir la formación de organismos verdes. Estos resultados, no obstante, no excluyen la posibilidad de que plástidos pequeños, desprovistos de clorofila pero siendo aún capaces de replicarse y formar cloroplastos, puedan mantenerse en organismos tratados por cortos períodos de tiempo con Sm.

De-Deken-Grenson y Godts (1960) encontraron que cuando células tratadas con Sm por períodos cortos, eran plaqueadas sobre agar, se formaban clones blancos o verdes, pero nunca formas intermedias. Una explicación para estos resultados es que el antibiótico inhibiese la replicación de alguna estructura "tipo gen" en el plástido, la cual se diluyera durante las subsiguientes divisiones celulares. Ahora, si la Sm se uniese a esas estructuras previniendo su replicación, se requeriría entonces, un intervalo de tiempo acompañado de división celular, para eliminarla o sea la división facilitaría el proceso de remoción. Sin embargo, si la división celular es rápida durante el intervalo de tiempo previo a que tenga lugar la recuperación, entonces se formarían más células blanqueadas. Las células recuperadas que contengan por lo menos, una unidad hereditaria intacta, deberían replicar dicha unidad con el objeto de recuperar su número normal de cloroplastos. Evidentemente, es necesario que la velocidad de recuperación sea mayor que la de división celular de lo contrario aumentaría el número de células blanqueadas. Bajo todas aquellas condiciones, por lo tanto, en que células de Euglena son tratadas con Sm por intervalos cortos de tiempo, luego lavadas para eliminar el antibiótico y finalmente plaqueadas, las co-

lonias pueden ser o totalmente verdes o totalmente blancas.

Sería posible obtener colonias mixtas puesto que, en algunos casos, la velocidad de división celular puede ser lo suficientemente rápida como para que se produzca antes que la replicación plástida dentro de la célula.

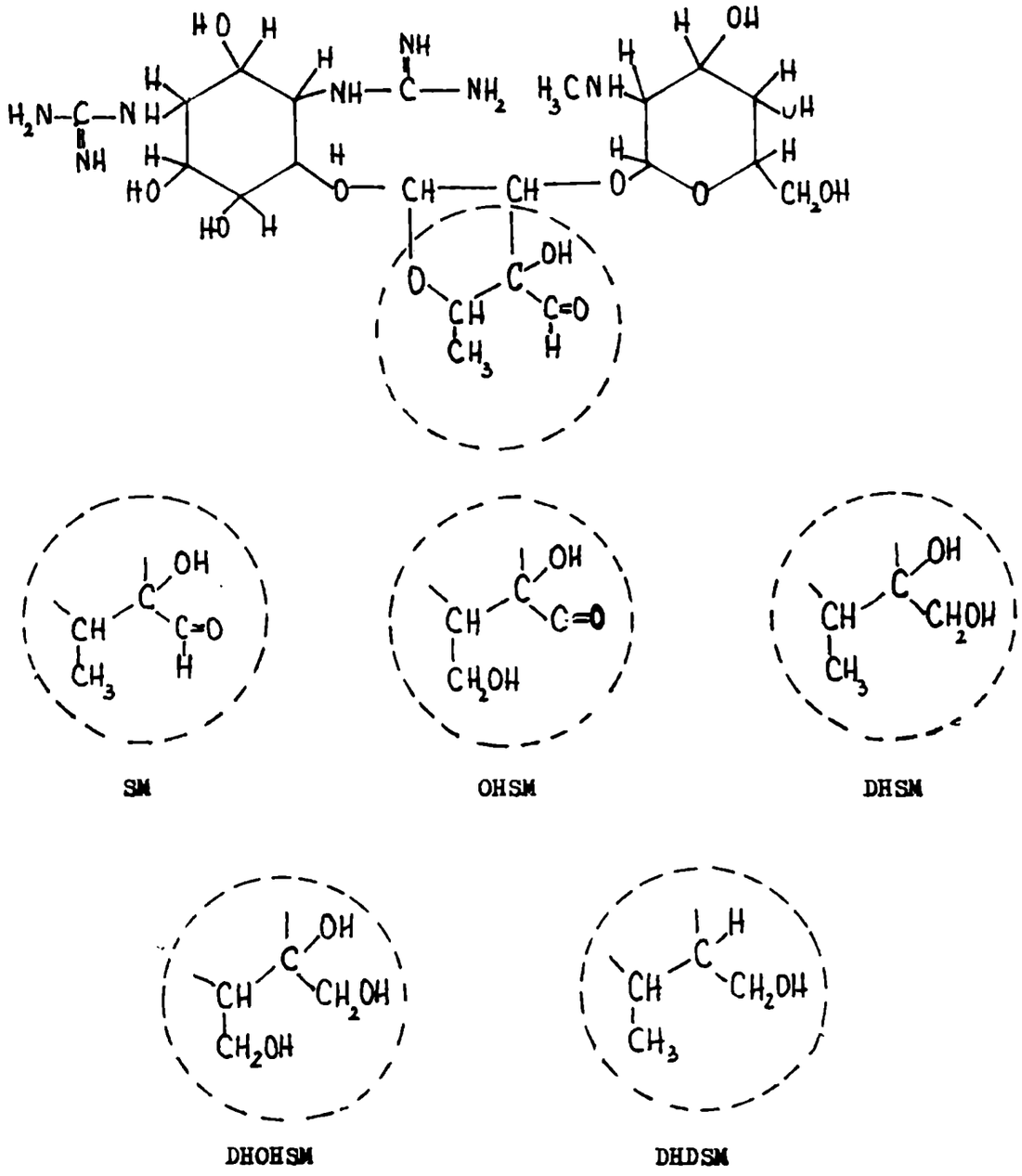
Robins et al (1953) obtuvieron así, desde colonias incoloras, amarillas, verdes pálidas hasta verdes, luego de exponer cultivos de Euglena a diferentes concentraciones de Sm y luego plaqueando en agar.

La Sm, en bajas concentraciones, tiene muy poco o ningún efecto sobre la velocidad de crecimiento (Provasoli et al, 1948) y no es prácticamente tóxica, para la mayoría de los protozoos, (Jirovec, 1949). Kirk (1962 a) encontró que este antibiótico inhibe la incorporación del carbono del acetato en proteínas a concentraciones similares a las que inhibe la síntesis de clorofila y la incorporación de leucina es inhibida en un grado ligeramente mayor que la síntesis de clorofila (Kirk, 1962 b). Esta inhibición también se observa en ausencia de luz; de cualquier modo las concentraciones de Sm empleadas por Krk en estos experimentos (200-400 ug/ml), eran mucho más elevadas que la necesaria para producir un blanqueamiento permanente de E. gracilis Z.

El blanqueamiento por Sm puede ser parcialmente inhibido, si están presentes en el medio cationes divalentes incluyendo el Mg (Rosen y Gawlik, 1961; Kirk, 1962 a,b); los más efectivos son el Mn y el Ca. El hecho de que el Mn sea más efectivo que el Mg en inhibir el blanqueamiento producido por Sm en Euglena, sugiere que este último efecto no es debido a la quelación del Mg. El Mn también, revierte la acción inhibitoria de este antibiótico sobre la incorporación de la leucina-^{14}C en las proteínas de Euglena.

Según Mego (1968) este efecto de los cationes divalentes es difícil de explicar; se sabía que la Sm forma quelatos con ellos (Foye et al, 1954) y por lo tanto, si la acción de este antibiótico fuese debido a la quelación de iones metálicos, cualquier agente quelante blanquearía Euglena; sería más probable entonces, que fuese el resultado de un efecto sobre el transporte del antibiótico dentro de la célula; lo cual había sido demostrado por Pramer (1956) en el alga Nitella. La incorporación de Sm en este organismo parece estar mediada por un sistema carrier que tiene un ion unido y que requiere para actuar cierto gasto de energía (Litwak & Pramer, 1957). Ca y Mg inhiben la incorporación del antibiótico pero los cationes monovalentes no tienen efecto. Según Drown et al (1969) la reversión de la acción inhibitoria de la Sm ejercida por los cationes divalentes (así como por otras especies de RNA), se deba posiblemente a una inactivación de la droga.

Sin embargo, como ya hemos visto en el punto X.7. Dubash & Rege (1970) reportaron que ciertos agentes quelantes, como la 8-hidroxiquinolina, EDTA, Na-DDC, inhiben la síntesis de clorofila en células de F. gracilis, con ligeras di



SM : streptomicina
DHSM : hidroxi-streptomicina
DHSM : dihidro-streptomicina
DHOHSM: dihidro-hidroxi-streptomicina
DHDSM : dihidro-desoxi-streptomicina

Figura 59b: Estructuras de las streptomicinas

ferencias entre sus efectos y esta inhibición podía revertirse por iones metálicos tales como Mg, Zn y Co.

Ebringer & Kupkova (1967) y Ebringer et al (1967) reportaron que la hidroxilamina revierte la acción blanqueante de la Sm. Así, el tratamiento de Euglena con hidroxilamina 10^{-1}M, durante 1 hora solamente, luego de 72 horas en presencia del antibiótico (300 ug/ml), resultaba en un 100% de colonias verdes, luego de lavar y plaquear las células sobre agar. El crecimiento por períodos más largos antes del tratamiento con hidroxilamina, producía progresivamente mayor cantidad de colonias blanqueadas. Se requerían sólo 16 horas de crecimiento en presencia de Sm para producir un 100% de colonias blancas. Los autores sugieren que la hidroxilamina inactiva o remueve la Sm unida quizás, al DNA plástido.

Siegesmund et al (1962) reportaron que E. gracilis Z crecida en ausencia de luz, con 10 mg/ml de Sm, recupera su capacidad para formar cloroplastos si las células son subcultivadas a medios libres del antibiótico, varias veces, antes de exponerlas a la luz. Sin embargo, se debe aclarar, que estos autores emplearon dihidroestreptomicina (DHSm) en sus experimentos y según trabajos de Mego (1968) este antibiótico no es tan efectivo como agente blanqueante en Euglena.

El grupo de Mego, empleando sulfato de estreptomicina, en concentraciones significativamente menores (10-1000 ug/ml) que Siegesmund et al (1962), no lograron obtener organismos verdes luego del crecimiento y subcultivo a medios sin antibiótico, varias veces, en la oscuridad (Mego & Buetow, 1966).

Las diferencias estructurales entre ambos antibióticos, les confieren propiedades distintas en cuanto a su capacidad de unión a aniones, en sus sitios catiónicos. La Sm (Figura 69a) tiene la posibilidad de formar un sitio catiónico por la unión de un aldehído y un grupo -NH cercanos, dando una imina cíclica, cargada positivamente, además de los sitios guanido catiónicos, comunes a ambos antibióticos. Por ello, la Sm tiene capacidad de formar uniones cruzadas con polianiones, mientras que su dihidro derivado tiene posibilidad de unirse a aniones en un solo sitio.

Por otro lado, la remoción de los grupos catiónicos de la DHSm anula su efecto antibiótico (Polglase, 1963); este hecho ha llevado a Polglase y otros investigadores (Bragg & Polglase, 1963) a postular que las propiedades catiónicas de los antibióticos derivados de la Sm, contribuyen a su actividad biológica. El hecho de que el dihidro derivado pueda actuar también como un agente blanqueante en Euglena, sugiere que no es necesaria una unión cruzada con la nucleoproteína para tener tal efecto, requiriéndose aparentemente, una sola unión; pero, sería un agente precipitante de ácidos nucleicos menos efectivo.

Partes de la molécula como la N-acetilglucosamina, guanidina, estreptamina o estreptobiosamina son inactivas como agentes blanqueantes (Hutner & Prova

soli, 1951), lo cual sugiere que, quizás se requieran otras propiedades, además de la presencia de grupos catiónicos, para inhibir la replicación del DNA plástico. Además como ya lo mencionamos, la capacidad blanqueante de la SM es afectada por el pH, localizándose, muy probablemente, este efecto a nivel de membrana celular, durante el transporte del antibiótico al medio intracelular.

En E. gracilis Z se requieren concentraciones mayores de DHSm para producir el mismo efecto blanqueante que la Sm; la presencia del sitio catiónico adicional de esta última quizás explique su mayor efectividad como agente blanqueante.

Concentraciones de Sm que blanquean células de Euglena en multiplicación no inhiben la formación de cloroplastos en células etioladas de Euglena que no están en división, siendo un proceso que involucra una significativa síntesis proteica. Considerando que concentraciones muy elevadas de este antibiótico, inhiben parcialmente el enverdecimiento en células que no están dividiéndose, quizás exista algún efecto sobre los ribosomas cloroplásticos pero éste no puede ser el sitio primario de acción de esta clase de antibióticos.

En 1969, Ebringer et al, reportaron los resultados obtenidos de un estudio comparativo de la acción de cinco Sm, como agentes blanqueantes de Euglena. Estos antibióticos diferían solamente en la mitad estreptrosa, algunos tenían grupos aldehídos y otros grupos alcohólicos. Encontraron que aquellas estreptomicinas que tenían un grupo aldehído en la parte estreptosa de la molécula (Figura 59 b) eran los más efectivos como agentes blanqueantes (Sm e hidroxiestreptomicina: OHSm), apoyando el modelo propuesto por Aronson et al (1964). Los derivados conteniendo un grupo alcohol secundario en lugar del aldehído (DHSm, dihidrosoxiestreptomicina: DHDSm, dihidrohidroxiestreptomicina: DHOHSm) ejercían el mismo efecto pero en concentraciones más elevadas.

No hay evidencias directas aún, para sugerir que estos antibióticos se unen directamente al DNA cloroplástico, no obstante, puede proponerse algún mecanismo que explique la habilidad de la Sm para eliminar permanentemente los cloroplastos de Euglena.

Zimmer, Triebel & Thrum (1967) han demostrado que ciertos antibióticos incluyendo la Sm y la DHSm, interactúan con el DNA, in vitro, aumentando el punto de fusión de estos ácidos nucleicos. Sus evidencias sugieren que esos antibióticos interaccionarían (cross-link) con el DNA por medio de fuerzas electrostáticas. Parecería razonable entonces, postular que los antibióticos pueden evitar o inhibir la separación de las cadenas del DNA, luego de la replicación en el cloroplasto (Ebringer et al, 10 ,1969).

En este mismo trabajo, Ebringer et al, compararon el efecto de la hidroxilamina como un agente que revierte la acción de estos antibióticos, lo cual es

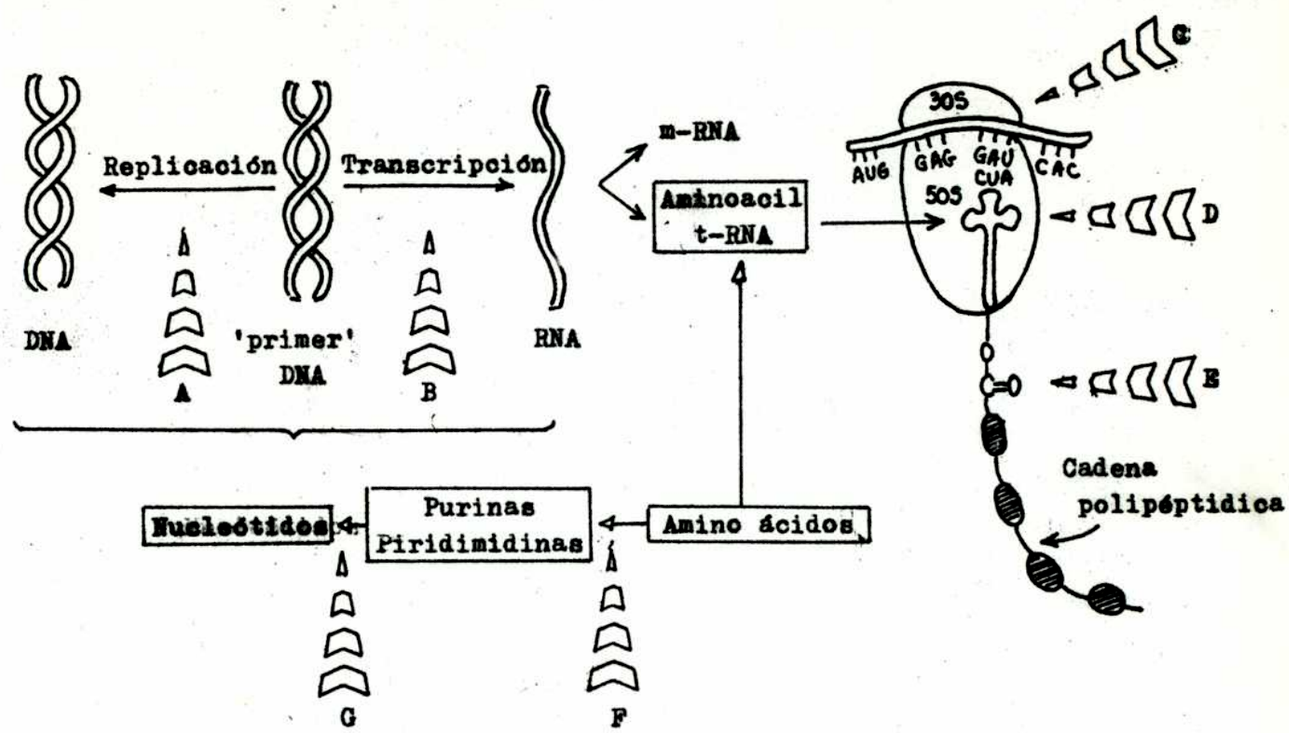
de gran interés, especialmente porque la hidroxilamina puede reaccionar con el aldehído para formar una oxima. Según los autores este compuesto puede actuar liberando los antibióticos de su interacción electrostática con el DNA cloroplástico, o sea removiéndolo de su sitio de acción, reaccionando con el grupo aldehído; o quizás tenga lugar primero esta última reacción y entonces el efecto de la hidroxilamina sería el de convertir a los antibióticos en compuestos que ya no son efectivos. Esta hipótesis requeriría, o bien un mecanismo de acción diferente para aquellos antibióticos que no contienen un grupo aldehído, o una unión menos eficiente al DNA.

Aproximadamente, se necesitan 6 divisiones previas al tratamiento con hidroxilamina para que éste no sea efectivo. Esto concuerda con la observación de Mego & Buetow (1967) de que se requería también ese mismo número de divisiones para obtener una pérdida irreversible de los cloroplastos inducida por crecimiento a temperaturas elevadas.

Ebringer et al (1969) también presentaron evidencias que la medida del contenido de clorofila no es siempre un índice válido de la eficiencia blanqueante permanente de los antibióticos; esto se puede explicar por las observaciones de Linnane & Steward (1967) de que los antibióticos macrolídicos no son agentes blanqueantes en Euglena.

En 1972, Ebringer & Foltinova reportaron que de los antibióticos investigados 38 incudían una pérdida permanente de los cloroplastos de E.gracilis resultando en la transformación de una cepa autotrófica a una cepa heterotrófica. Estas mutaciones tenían una frecuencia muy alta, la mayoría de los antibióticos inducían mutaciones en el 100% de la población. Estos antibióticos, llamados "depigmenting" atacan el DNA plástido, previniendo su replicación. La división celular no se interrumpía pero se producía una pérdida gradual de los cloroplastos, requiriéndose para su eliminación total de 4 a 5 divisiones.

Diamond (1976) estudió en E. gracilis la inhibición diferencial, ejercida por la Sm sobre la fotosíntesis en presencia de una síntesis continua de clorofila. La Sm ejerce un efecto muy poco significativo sobre la síntesis de clorofila cuando se agrega durante los últimos estados del desarrollo cloroplástico. Ellos investigaron exhaustivamente este fenómeno y demostraron que si la Sm se agregaba a un cultivo de Euglena, a las 24 horas de comenzado el desarrollo, tenía una acción inhibitoria diferencial sobre el grado de síntesis de varios parámetros asociados a los cloroplastos. La síntesis de clorofila, carotenoides, cit. 552 y la actividad de Hill del fotosistema I, estaban todos ligeramente inhibidos y aproximadamente en el mismo grado, entre las 24 y 72 horas del desarrollo. En cambio, encontraron una inhibición muy fuerte sobre la síntesis de la enzima ribulosa difosfato carboxilasa y sobre la actividad de Hill del fotosistema II.



A

Rubiflavina
Antramicina
Mitomicinas
Sarcomicina
Streptonigrina
Edeina
Primicina
Acido Nalidéxico
Mixina
Novobiocina
Fleomicina NB
Carcinofilina
Nitrosoduanidina
Nitrosofuranos
Luz U.V.

B

Actinomicina D NB
Nogelamicina NB
Cinerubina NB
Cromomicina NB
Dauromicina NB
Equinomicina NB
Mitramicina NB
Olivomicina NB
Rifamicina NB
Rifampicina NB

C

Streptomicinas
Neomicina NB
Kanamicina
Paranomicina
Gentemicina
Higromicina B
Viomicina
Spectinomicina
Tetraciclina NB
Clortetraciclina
Oxitetraciclina
Edeina

D

Cloranfenicol NB
Angolamicina
Carbomicina
Eritromicina
Calcomicina NB
Metimicina NB
Picromicina NB
Spinamicinas
Oleandomicinas
Streptograminas
Vinidogriseina NB
Lincomicinas
Sparsomicinas NB

E

Puromicinas NB
Blasticidina NB
Amicetina
Gougerotina

F

Hedacidina NB
Azaserina NB

G

Cordicepina NB
Turbecidina NB
Formiacina NB
Psicofuramina NB
Decoyimina NB
Citosina - arabinósido NB

Figura 60: Distribución de los antibióticos según su sitio de acción en otros organismos sensibles. NB indica actividad blanqueante no permanente.

XII.3.3. Algo más sobre antibióticos:

Otros antibióticos que actúan como agentes blanqueantes en Euglena son: Kanamicina, paranomicina, neomicina (Zahalsky et al., 1962; Ebringer, 1962 b,c), eritromicina, carbomicina, picromicina y metimicina (Ebringer, 1962 a). Todos estos antibióticos están relacionados estructuralmente desde el punto de vista de que todos contienen amino-azúcares. Según Ebringer (1962 b), las propiedades básicas débiles de estos compuestos pueden ser las responsables de sus efectos sobre los cloroplastos.

Sin embargo, la viomicina, que no contiene un grupo aminoazúcar, tiene igualmente propiedades blanqueantes, pero la oleandomicina que sí lo tiene, no presenta efectos sobre los cloroplastos de Euglena (Ebringer, 1962 b).

La paranomicina y neomicina son tóxicos para Euglena, pero la kanamicina es el agente blanqueante más potente (Zahalasky et al, 1962; Ebringer, 1962 c), pero no es tan tóxica como la Sm. Ambos efectos, blanqueante y tóxico, son revertidos por iones Mg, histidina, ácido urocánico o una combinación de pantotenato, ácido nicotínico y treonina. La histidina revierte los efectos tóxicos y blanqueantes de la neomicina y paramomicina, prácticamente en forma total; pero sólo parcialmente los correspondientes a la Sm y kanamicina. Los aminoácidos arginina y lisina ejercen también una protección pero muy débil. Zahalasky et al. (1962) postularon que el Mg y quizás otras sustancias, como histidina, pueden revertir estos efectos inhibiendo el transporte a través de la membrana de Euglena, al competir por el mismo sitio de unión en el sistema carrier que transporta el antibiótico hacia el interior de la célula.

El agente antitumoral, antramicina, también provoca el blanqueamiento de Euglena (Gutman & Tendler, 1966), siendo más efectivo en organismos crecidos en la luz y observándose mayor cantidad de colonias blanqueadas sobre la superficie del agar que en profundidad. Este compuesto parece inhibir la síntesis de RNA, DNA-dependiente en un modo similar a la actinomicina (Pantelakis et al., 1966), a pesar que su efecto como un agente blanqueante en Euglena, antes que como un inhibidor temporario del enverdecimiento y el efecto de aerobiosis, sugieren un modo diferente de acción que la actinomicina.

La aureomicina tiene cierta actividad blanqueante, a pesar que es mucho menos efectiva que la Sm; cuando se hacen crecer células de Euglena, en presencia de una concentración de 5 mg/ml de aureomicina, sólo el 10% de las colonias resultan afectadas (Robins et al., 1953). Ebringer et al (1969) lograron demostrar que la aureomicina ejercía únicamente una inhibición temporaria sobre la formación del cloroplasto, bajo una variedad de condiciones.

Ya mencionamos que la miomicina, un nuevo antibiótico de la familia del ciclital tenía efectos muy similares a los producidos en Euglena, por Sm y va-

rios antibióticos aminoglucosídicos blanqueantes, actuando a nivel ribosomal. (Fasulo et al., 1977 a,b; 1978).

Ebringer (1972) estudió la acción de 144 compuestos sobre los cloroplastos de Euglena gracilis Z, de los cuales la mayoría eran antibióticos pero también incluyó compuestos que no lo eran, pero que estaban estructuralmente relacionados con ellos y productos de degradación de los mismos antibióticos.

De todos ellos, sólo 46 presentaron acción blanqueantes, o sea produjeron una pérdida irreversible de los cloroplastos y la mayoría inhibía la síntesis de clorofila.

Ebringer clasificó en 2 tipos generales a los compuestos que tenían acción blanqueante, de acuerdo a sus mecanismos de acción en otros sistemas.

I) Inhibidores de la síntesis de DNA: antramicina, edeína, porfiramicina, algunas mitomicinas, mixina, ácido nalidíxico y sus derivados, novobiocina, primicina, rubliflavina, sarcomicina y estreptonigrina;

II) Inhibidores de la síntesis proteica: 29 antibióticos los cuales tenían como común denominador en su estructura una amino-hexosa y 3 antibióticos los cuales no tenían un amino azúcar en su estructura: viomicina, estreptogramina y pactamicina.

Sólo estos dos tipos de antibióticos se comportaban como agentes blanqueantes; otros compuestos, los cuales inhibían la síntesis de la pared en bacterias, o la síntesis de RNA, pirimidina y purina, o los que producían cambios en la permeabilidad de la membrana, o inhibían el transporte de electrones; no eran efectivos como agentes blanqueantes.

En la Figura 60 se muestra la distribución de los antibióticos de acuerdo con sus sitios de acción en otros organismos sensibles. Entre los 19 compuestos inhibidores de la síntesis de DNA probados en Euglena, 5 no tenían actividad blanqueante. Su pérdida de actividad blanqueante puede ser explicada, según Ebringer (1972), sobre las bases de su alta toxicidad; por ejemplo la pleomicina tiene una alta afinidad también por el DNA nuclear y, por lo tanto, las células no sobreviven el ataque de esta droga. Ebringer et al. (1969) observaron un efecto similar para la mitomicina y los antibióticos relacionados, los derivados más tóxicos de la mitomiciana (mitomicina A y C) no podían ser agregados a los cultivos de Euglena en cantidad suficiente como para indicar el blanqueamiento sin matar a las células. Lo mismo ocurre con la carzinofilina.

Entre los compuestos que inhiben la síntesis proteica, había muchos con actividad blanqueante. La mayoría de los miembros del grupo de las estreptomicinas exhibían una fuerte acción blanqueante, con la excepción de algunos de ellos.

En el grupo de los antibióticos "macrolide", los más efectivos eran los básicos, con 2 componentes "azúcar" en sus moléculas, uno, una hexosa neutra y el

otro, una aminohexosa.

Por otro lado, los antibióticos "macrolide" neutros, los cuales contienen sólo un azúcar neutro, no blanqueaban Euglena irreversiblemente. Parecía existir una correlación exacta entre la actividad antibacteriana y antiplastídica en muchos de estos compuestos (Celmer y Ebringer, 1967).

El cloranfenicol y sus estereoisómeros, los cuales inhiben la síntesis de proteínas en organismos que contienen ribosomas 70 S, así como en los cloroplastos, no producen una pérdida irreversible de los plástidos en Euglena. Igualmente inactivas son las tetraciclinas, anisomicina, cicloheximida, esparsomicina y otros inhibidores de la síntesis proteica. Por otro lado, antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas en los ribosomas 80 S, como la cicloheximida, no deberían inhibirla en los cloroplastos, pero sí lo hacen; esto nos indica la interacción cooperativa entre los cloroplastos y el citoplasma que los rodea y el núcleo.

Si bien aún no está totalmente aclarado el modo de acción de los antibióticos, la acción del cloramfenicol, el cual es un inhibidor específico de la síntesis proteicas en los cloroplastos, sugiere que otros procesos o mecanismos además de este último, están involucrados en el blanqueamiento. Parece más razonable pensar que sustancias que atacan o dañan el DNA cloroplástico, tienen mayor capacidad para inducir otros cambios que lleven a la pérdida irreversible de los cloroplastos, que sustancias las cuales actúen en otros sitios (Ebringer et al., 1972).

XII.3.4. Antihistaminas y otros agentes químicos blanqueantes

Las antihistaminas causan la pérdida permanente de los cloroplastos en Euglena, en una forma similar a los antibióticos de la familia de la Sm (Gross et al. 1955).

i) El más estudiado y quizás el más efectivo es el compuesto piribenzamina, a pesar que no es tan efectivo como la Sm. Liang-Tong et al (1965) reportaron que el subcultivo de células a un medio libre de piribenzamina, luego de 20 días de crecimiento en presencia de la droga, daba como resultado un cierto grado d- enverdecimiento.

Zahlasky et al (1962) probó un gran número de estas drogas; todas inhibieron la división celular, pero algunas no tenían actividad blanqueante; por ejemplo, antazolina, piratiazina y prometazina; difenilhidramina y fenindamina blanqueaban reversiblemente a concentraciones de 30 mgr %; y tripelennamina; metapirilena y pirilamina blanqueaban irreversiblemente.

ii) Otro agente que es un blanqueante efectivo es la N-metil-N'nitro-N-nitrosoguanidina (MNG) (Mc. Calla 1965 b); a concentraciones del orden de 8 ugr/ml

produjo un 98% de colonias blanqueadas, luego de sólo 8 horas de exposición a la droga. Provoca una inhibición temporaria del crecimiento celular por varias horas; luego la velocidad de crecimiento regresa a su valor normal, pero las células ya son incapaces de formar cloroplastos.

Mc. Calla (1962 y 1965) probó el efecto de 12 derivados del 5-NO_2 furano sobre E. gracilis; todos tenían alguna acción blanqueante, pero varios de ellos eran elativamente tóxicos. Analizando comparativamente la estructura de estos compuestos, concluyó que se requería la presencia de un grupo nitro en la posición 5, para que tengan acción blanqueante. Puesto que una alta proporción de las colonias blanqueadas resultaron de una exposición a estos agentes durante sólo 2 generaciones; Mc. Calla concluyó que los nitrofuranos actuaban dañando directamente el sistema cloroplástico antes que inhibiendo su replicación. Además de su acción blanqueante, la nitrofurantoína y el nitrofuraldehído, inhibían el enverdecimiento de células etioladas expuestas a la luz. En este aspecto se diferencian de la Sm y derivados análogos. Mutantes de E. coli resistentes a la luz U.V.; eran también resistentes a estas drogas, por lo tanto Mc. Calla concluyó que los nitrofuranos dañan el DNA; así, su acción blanqueante en Euglena, podrían involucrar una interacción con los ácidos nucleicos de los cloroplastos; inhibiendo quizás, tanto la función como la replicación del DNA plastido (Mc. Calla, 1965 c).

Los agentes alquilantes, azoserina, mitomicina c, acridinas, ácido nitroso, hidroxilamina y radiaciones , no blanquean proporciones significativas de las células; aun a concentraciones suficientes para matar la mayor parte de ellas (Mc. Calla, 1965 b).

En una publicación posterior (1966) Mc. Calla estudió el efecto de varios análogos de la NMG como agentes blanqueantes en Euglena. Observó que todos los compuestos activos contenían un grupo N-alquil-N-nitrosoamina; y aquellos análogos en los cuales el grupo -NO, estaba reemplazado por un hidrógeno o un grupo -NO_2, no eran efectivos.

Otra observación interesante hecha por Mc. Calla (1966) es que parecería existir muy poca relación entre la eficiencia de estos compuestos como antileucémicos y su capacidad blanqueante en Euglena.

También es significativo, señala el autor, que los 3 agentes blanqueantes más efectivos, MNG, metilnitrosourea y N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida, liberan diazometano en soluciones básicas. M. Calla o-servó que la nitrosoguanidina y la metilnitrosourea en soluciones acuosas neutras producen N_2, presumiblemente formado vía diazometano, el cual se destruye rápidamente en agua para dar metanol y nitrógeno. La acumulación de N_2 es, por lo tanto, una indicación de que el diazometano se ha formado aun a valores de pH cercanos a la neutralidad. Sin embargo, la potencia de estos compuestos no está directamente relacio-

nada con la cantidad de diazometano formado en solución. Por ejemplo, la MNG produce más diazometano (medido por la acumulación de N_2) a pH: 6,8 que a 3,5; mientras que la droga es más efectiva en el pH más bajo.

Es posible, por supuesto, que la MNG, en las células pueda servir como un precursor "in situ" de diazometano; pero fue imposible probar la acción del diazometano sobre Euglena, debido a su extrema labilidad en soluciones acuosas.

El hecho de que el tratamiento de varias aminas orgánicas con MNG, produzca, tanto derivados de nitroguanidina como derivados metilados, sugiere la posibilidad de que la metilación no sea el único resultado de la reacción de la MNG con los constituyentes celulares.

iii) La O-metil-treonina (β - metoxitreonina), aminoácido análogo de la L-isoleucina, inhibe la multiplicación y la síntesis de clorofila en E. gracilis Z (Aaronson & Bensky, 1962). Bajas concentraciones (1-10 mgr %) no inhiben la división celular, pero producen un blanqueamiento irreversible en los cultivos. La pérdida permanente de la capacidad para formar cloroplastos es inhibida competitivamente por L-isoleucina, L-treonina; L-homoserina y ácido aminobutírico o cetobutírico. El ácido tíglico, intermediario en la biosíntesis de isoleucina, y L-metionina también revierten la acción de la O-metiltreonina. Los D-isómeros no son efectivos como agentes que revierten su acción blanqueante; pero previenen, parcialmente, la inhibición de la división celular por esta droga.

Estas observaciones sugieren que la O-metiltreonina interfiere con la utilización de L-isoleucina; posiblemente el anál go pueda ser incorporado en su lugar, en alguna proteína involucrada en la replicación de los plástidos.

XII.3.5. Deficiencia de Mg:

El crecimiento de E. gracilis, en ausencia de luz, y en un medio deficiente en Mg, causa un blanqueamiento permanente (Dubash y Rege, 1967). Por lo tanto el Mg parece ser un elemento indispensable para mantener la continuidad plástica; quizás en la síntesis de la pequeña cantidad de clorofila asociada con células crecidas en la oscuridad. La incapacidad para producir esta clorofila produce, aparentemente, la pérdida de la estructura plástida completa, incluyendo el mecanismo de replicación.

En 1978, Zielinski y Price, confirmaron estos resultados, reportando que a medida que disminuye la cantidad de Mg en el medio, menor es la velocidad de síntesis de clorofila y de proteínas, siendo la disminución de éstas previa y posiblemente la causa de la disminución en la síntesis de clorofila, lo cual concuerda con las observaciones de Kirk & Allen (1965).

XII.3.6. Presión:

Altas presiones pueden producir algún daño permanente en el sistema cloroplástico de Euglena (Gross, 1965); por ejemplo, si se aplica una presión de 100 atm. durante media a una hora, sólo permanecerá viable el 1% de los organismos y 20 minutos ó 2 horas a esta misma presión, produce un 20% de colonias blanqueadas. Sin embargo, la presión no es un agente blanqueante efectivo si se lo compara con los agentes químicos o temperaturas elevadas.

XII.3.7. Temperatura:

La mayoría de las cepas de Euglena pierden sus cloroplastos y se blanquean irreversiblemente cuando crecen a temperaturas de 34-35°C; algunas tienen un máximo cercano a 27°C.

Puesto que el enverdecimiento de organismos crecidos en la oscuridad, bajo condiciones en las cuales no se dividen, no es afectado por temperaturas elevadas, el fenómeno debe estar estrictamente relacionado con la división celular y, por lo tanto, es muy probable que también esté afectada la replicación de los cloroplastos. El crecimiento de E. gracilis Z es exponencial a 34-35° C, pero la formación de cloroplastos es lineal con el tiempo (Brawerman & Chargaff 1954 b).

Cuando Euglena crece a 34,5°C, la velocidad de división celular no se ve afectada, pero la densidad final del cultivo es considerablemente menor (Mego & Buetow, 1965).

El número de divisiones celulares a temperaturas elevadas determina el grado de blanqueamiento; así si se inoculan células a una alta densidad, sólo tendrán lugar unas pocas divisiones a 34,5° C y por lo tanto, no se producirá blanqueamiento. Sin embargo, si las células se inoculan a una densidad inicial menor que aproximadamente 10^3 células/ml; tendrán lugar un gran número de divisiones, en un tiempo relativamente corto (4-6 días) como para producir un cultivo permanente blanqueado. Se requieren, por lo menos, 7 divisiones, para obtener un cultivo incapaz de recuperarse del efecto de temperaturas blanqueantes; la pérdida de cloroplastos por crecimiento, en ausencia de luz o en presencia de Sm , también requiere aproximadamente este número de divisiones. Si las células sometidas a temperaturas blanqueantes, se colocan luego a temperaturas normales, antes que los cloroplastos se pierdan por completo, estas células pueden recuperar la capacidad de sintetizar clorofila a sus

valores normales, siempre y cuando la velocidad de división celular sea lenta (Brawerman & Chargaff, 1959 b, 1960).

La capacidad de las células de Euglena parcialmente blanqueadas por este método, para sintetizar clorofila a temperatura ambiente, es inhibida por 5-F.U. El mismo grado de inhibición ocurre si el 5-F.U. se agrega en cualquier momento, durante las 48 hrs. siguientes a la remoción del agente blanqueante. Además la presencia de 5-F.U. no previene la recuperación de los organismos parcialmente blanqueados por calor; y si éstos se colocan en presencia de la droga, durante 24 hrs. a temperatura ambiente, no se blanquean irreversiblemente luego de varias divisiones en medio fresco a temperaturas elevadas. Esto sugiere que el 5-F.U. no previene la recuperación, pero que podría inhibir la síntesis de algún componente en el período siguiente al de recuperación, probablemente los ribosomas. Estas observaciones también indican que la formación de los ribosomas cloroplásticos es inhibida o reducida durante el crecimiento de Euglena a 34.5°C; debido a la inhibición de algún componente requerido para su formación. Este componente recupera su actividad o sería reemplazado, durante un período a temperatura ambiente, y la formación de ribosomas puede continuar a 34,5°C, con la condición de que el componente no se haya agotado. Células parcialmente blanqueadas, las cuales han tenido un período de recuperación a temperatura ambiente, en presencia de 5-F.U, son capaces de sintetizar clorofila, cuando se las transfiere a la temperatura de 34,5°C. Esto sugiere que la replicación de dicho componente, antes que su función, es inhibida por el crecimiento de Euglena a temperaturas elevadas.

Bajas concentraciones de sulfato de Sm (1.0 µgr/ml) inhiben completamente la síntesis de clorofila en Euglena, parcialmente blanqueada por calor, a temperatura ambiente, si el antibiótico se agrega inmediatamente de finalizado el período de exposición a 34,5°C. Si se lo agrega luego que han pasado 24 hrs. a temperatura ambiente, la síntesis de clorofila resulta inhibida en sólo un 50% con respecto a los controles. Este efecto de la Sm se puede eliminar también en la misma forma, si las células se colocan en la oscuridad y a temperatura ambiente para su recuperación.

Por lo tanto, la Sm en estos organismos parecería ejercer su acción sobre algún proceso previo al inhibido por 5-F.U. Así, si las células se mantienen, por ejemplo, un corto período de tiempo a tem-

peratura ambiente, se convierten en células parcialmente resistentes al efecto inhibitorio del antibiótico.

En cambio, el proceso sensible al 5-F.U. no tiene lugar hasta, por lo menos, 24 hrs. a temperatura ambiente; en este aspecto las células se comportan de un modo similar a células de Euglena, crecidas en oscuridad y luego expuestas a la luz.

El desarrollo de los cloroplastos, inducido por la luz, en células etioladas no resulta afectado en forma significativa por Sm (10 ugr/ml) o por temperaturas elevadas.

Por lo tanto, células de Euglena, parcialmente blanqueadas por acción del calor, parecerían perder algún componente, que se encontraría presente en células normales crecidas en ausencia de luz. Este componente se recuperaría rápidamente por un corto período de exposición a temperatura ambiente; pero, esta recuperación parece ser inhibida por Sm. Dicho componente podría ser requerido para la replicación plástida, y el proceso sensible a este antibiótico en la recuperación a temperatura ambiente de células de Euglena, parcialmente blanqueadas por el calor, podría ser la replicación de los mismos plástidos en las células.

La DHSm también previene la síntesis de clorofila a temperatura ambiente en estas células blanqueadas por el calor; sin embargo, se requieren concentraciones mayores para producir el mismo grado de inhibición que la Sm. El efecto producido por este último se puede suprimir lavando las células; subcultivándolas a medio fresco y dejándolas crecer por varias generaciones; luego de este tratamiento la cantidad de clorofila que sintetizan es comparable a la normal.

Esto sugiere que la Sm como ya dijimos se debe unir a algún componente, inhibiendo la recuperación, pero si éste se retira del medio, dicho componente puede reasumir nuevamente su función en el desarrollo de los cloroplastos.

Se puede especular que se trataría del DNA cloroplástico, el cual es responsable de la replicación plástida y de la formación de los ribosomas cloroplásticos; todavía no se cuenta con evidencias directas suficientes que comprueben completa y claramente estas hipótesis.

En 1974, Cook et al reportaron que células de E. gracilis Z podían perder irreversiblemente la capacidad para desarrollar sus cloroplastos, bajo condiciones fisiológicas. El método consistía en la

transferencia de un medio en el cual las células se desarrollan perfectamente bien a otro medio diferente en el cual pueden seguir creciendo igualmente bien. Específicamente las condiciones óptimas para que ocurra el blanqueamiento eran: la transferencia de un medio orgánico a un medio definido, la ausencia de luz y temperaturas de 30°C (temperatura óptima para la multiplicación), aunque cada uno de estos factores, solos, no tengan acción blanqueante.

El grado de blanqueamiento de la población era casi del 100%, pero exhibía una fuerte dependencia de las siguientes condiciones: el pH del medio definido y su contenido de fosfato; la edad del cultivo madre en el momento de la transferencia y la longitud del período de tiempo que pasaba hasta que comenzara la división celular en el medio definido.

Los estudios con microscopía de fluorescencia y electrónica indicaban que el blanqueamiento era el resultado de la pérdida de todos los plástidos; el análisis de la cinética del proceso indicaba que esta pérdida no era solamente consecuencia de una dilución de los plástidos funcionales por una continua división celular en ausencia de replicación de los proplástidos, puesto que la aparición de células blanqueadas ocurría demasiado rápido.

Los autores sugieren que la transferencia de un medio a otro induce el blanqueamiento principalmente por una inactivación ("Killing") de los proplástidos; los cuales luego se diluyen a través de las generaciones siguientes.

Mientras que la velocidad óptima de multiplicación y la ausencia de luz son requisitos para este proceso de blanqueamiento, ellos solos no lo producen; Euglena puede crecer indefinidamente en la oscuridad a 30°C, con varias transferencias a un medio definido, sin pérdida de su habilidad para enverdecer. La temperatura y la ausencia de luz juegan así un importante, pero sólo sinergístico, rol en este proceso.

Mientras que este blanqueamiento probablemente sea el resultado de una acción física o química; su mecanismo es muy diferente del descripto para otros agentes físicos, como la luz U.V. o temperaturas supraóptimas y ciertamente, diferente también de la acción de todas las drogas que blanquean Euglena.

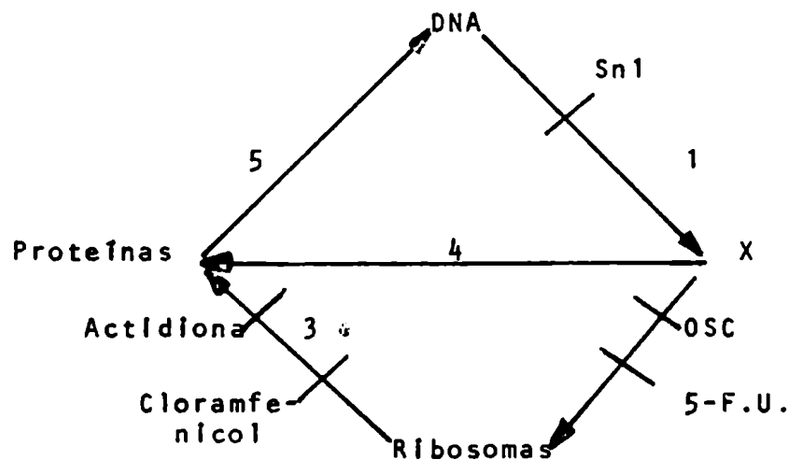
La pérdida de la herencia plástida, como resultado de la transferencia de un medio complejo a un medio definido podría ser así, la expresión de una tercera clase de agentes blanqueantes para

Euglena. Además, esta última forma de blanqueamiento, es un proceso que puede ocurrir fácilmente en la naturaleza y por lo tanto, provee (junto con las temperaturas elevadas) una explicación del origen natural y reciente de protozoarios flagelados incoloros (no-coloreados o sin color).

XII.4. CONCLUSIONES

La capacidad de las células de Euglena, parcialmente blanqueadas, para sintetizar clorofila a 34,5°C, luego de un período de recuperación a temperatura ambiente, excluye la posibilidad de que se esté inhibiendo una función enzimática. Por la misma razón, es igualmente improbable que sea un efecto sobre algún lípido de bajo punto de fusión.

Mego, (1968) resume todos los eventos descriptos en el siguiente esquema:



Agentes blanqueantes como la Sm y temperaturas elevadas, interfieren con la replicación del DNA plástido; si esto es cierto, entonces X sería también DNA.

Los pasos 1,4 y 5 pueden ocurrir tanto en presencia como en ausencia de luz, y, en la oscuridad ellos serían responsables de la continuidad de los proplástidos, de generación en generación.

Los pasos 2 y 3 dependen de la presencia de luz y dan como resultado la formación de cloroplastos.

Otros agentes blanqueantes también podrían ser incluídos en este esquema por ejemplo la luz U.V. probablemente actúe en forma directa sobre el DNA y se la puede ubicar en el paso 1. Los nitrofuranos también afecten posiblemente este mismo paso. La Hadacidina podría actuar a nivel del paso 2 y la O-Me-treonina podría bloquear el paso 5.

XIII. ESTUDIOS SOBRE LA BIOSINTESIS DE LOS TETRAPIRROLES EN EUGLENA GRACILIS

XIII.1.- INTRODUCCION

A pesar que se han detectado un gran número de enzimas cuyas propiedades han sido exhaustivamente estudiadas, así como también la mayoría de los caminos metabólicos en los cuales están involucradas; muy poco es aún lo que se conoce acerca de las enzimas que participan en la biosíntesis de las porfirinas en E.gracilis. Es ésta unade las razones por la cual hemos elegido a este organismo para el presente estudio; además de las amplias posibilidades que ofrece para modificar su contenido de clorofila (tetrapirrol clave del proceso fotosintético), ya sea por crecimiento en luz u oscuridad; variaciones en la temperatura del cultivo, y/o en la intensidad de la luz; modificaciones del medio de crecimiento (agregando ciertas drogas o en deficiencia de ciertos nutrientes), etc. Así, es de esperar que los cambios en el contenido de clorofila estén relacionados con alteraciones en todos o por lo menos algunos de los precursores de este pigmento, como así también en las enzimas que llevan a su síntesis.

Evidentemente si a todo lo expuesto le sumamos las ventajas ya descriptas en el punto I, debemos concluir que E. gracilis parecería ser el organismo experimental por excelencia para el estudio de la biosíntesis de los tetrapirroles y compuestos relacionados.

XIII.2.- RESEÑA DE LOS TRABAJOS RELACIONADOS DIRECTAMENTE CON LA SINTESIS ENZIMATICA DE LOS TETRAPIRROLES

Ya en 1958, Granick y Mauzeral reportaron la presencia en Euglena de una enzima (s) particulada, que oxidaba las 2 cadenas propiónicas del Coprógeno III, pero no del I, a 2 grupos vinilos.

De acuerdo con sus resultados, sugirieron que la oxidación no se realizaba a través de un intermediario que portara un grupo -COOH; esta fracción enzimática (que podría contener una o más enzimas), no tenía requerimiento de metales ni presentaba grupos -SH esenciales para su actividad catalítica.

En 1962, Gibor y Granick, presentaron evidencias experimentales que apoyaban la hipótesis de que células de E.gracilis Z blanqueadas espontaneamente, por tratamiento con estreptomicina o sometidas a la acción de la luz U.V. o a temperaturas elevadas, presentaban en su interior organelas a las cuales identificaron como prplástidos de aproximadamente 2μ de diámetro.

La aparición de células de Euglena blanqueadas espontáneamente fue descripta por primera vez por Ternetz, en 1912 y años más tarde en 1953 Robins et al. reportó que aproximadamente 0,003% de las células normales

daban lugar a la formación de colonias "blancas" luego de varios subcultivos.

Ternetz (1912) había sugerido que las células blanqueadas aparecían cuando los plástidos se estaban dividiendo a una velocidad menor que las células mismas. Sin embargo Gibor y Granick (1962) no obtuvieron resultados coincidentes con los de Ternetz (1912) sino que, por el contrario, bajo sus condiciones de cultivo la aparición espontánea de células blancas no era debida a una diferencia entre las velocidades de división celular y multiplicación plástida.

Según los autores, la palabra "bleached", no significa que la célula sea blanca o incolora, sino que se emplea para describir aquellos organismos que han perdido su capacidad para sintetizar clorofila y desarrollar cloroplastos maduros; y por lo tanto, su color puede variar desde el amarillo hasta marrón oscuro. Asi, los clones blanqueados espontáneamente, se pueden ordenar y clasificar de acuerdo con su grado de pigmentación.

El clon mas pigmentado, entre aquellos blanqueados espontáneamente, B6In7W, contenía aproximadamente 10 pequeñas estructuras amarillentas dentro de la célula, las cuales tenían fluorescencia roja cuando se observaba bajo el microscopio de fluorescencia. Además contenían gránulos densos distribuídos en su interior o en la periferia. Todas estas observaciones indicaban que estas estructuras eran plástidos modificados que, por alguna razón desconocida, habían perdido su habilidad para desarrollar cloroplastos. Su identificación como proplástidos se confirmó luego por comparación con las estructuras encontradas en células normales, crecidas en oscuridad.

Una segunda cepa, blanqueada espontáneamente, que estaba menos pigmentada, poseían proplástidos similares pero sólo en unas pocas células de este clón, se observaba una fluorescencia tenue.

El tercer tipo de células presentaba un color amarillo muy pálido y solo con microscopia de fase se observaban algunas vesículas pero no tenían pigmentos ni fluorescencias.

Todos los clones blanqueados espontáneamente contenían gránulos de paramilon dentro de las células, lo cual es otra indicación de la presencia de plástidos. También las células de Euglena blanqueadas espontáneamente poseían aún gránulos de paramilón y acumulaban una considerable cantidad de carotenoides cuando se exponían a la luz. Estas células contenían estructuras similares, aparentemente, a aquellas observadas en los clones blanqueados espontaneamente.

Para verificar la identidad de dichas estructuras como plástidos, las células tratadas con estreptomicina se incubaron en presencia de δ -ALA por varias horas, a 30°C. Luego de 4 horas de incubación se observaba una fluorescencia roja bien definida dentro de las células. Esto indicaba que la biosíntesis de porfirinas no estaba alterada. Además, la observación micros-

cópica de las células rotas revelaba que dicha fluorescencia estaba localizada en las estructuras proplástidas; en varios casos se detectaban aproximadamente 12 de las mismas por célula; estando muchas de ellas asociadas a partículas de paramilón.

Basándose en estas observaciones, Gibor y Granick (1967) concluyeron que los plástidos no desaparecen luego del tratamiento de las células con estreptomicina, sino que son incapaces de diferenciarse en cloroplástos maduros. Observaron también que si las células blanqueadas con estreptomicina se hacían crecer en la luz, tenía lugar un aumento de la síntesis enzimática de porfirinas a partir de δ-ALA.

Una cepa de Euglena, blanqueada por crecimiento a 35°C, presentaba las mismas características que las descriptas anteriormente; plástidos que no fluorescían dentro de las células pero que acumulaban porfirinas cuando se incubaban con δ-ALA.

En cambio, una cepa blanqueada por tratamiento con luz U.V., si bien las células presentaban proplástidos similares, no sintetizaban porfirinas a partir de δ-ALA.

De acuerdo con los resultados obtenidos y aplicando todos los criterios estudiados, los autores clasificaron las diferentes cepas descriptas,en orden decreciente de la estructura plástica, como se indica a continuación :

i) Proplástido I.:representado por los plástidos de las células expuestas a la luz U.r. y la cepa PW3 blanqueadas espontáneamente,ya no sintetizan porfirinas a partir de δ-ALA, lo cual implica la ausencia de las enzimas activas pertenecientes al camino biosintético de las porfirinas. Además estos plástidos tienen la concentración más baja de carotenoides.

ii) Proplástido II: representado por los plástidos de aquellas cepas blanqueadas con estreptomicina y por calor (35°C); no presentan fluorescencia, lo cual indica ausencia de porfirinas en las células pero son capaces de sintetizarlas luego de la edición de δ-ALA. Si estas se hacen crecen en la luz, el contenido de carotenoides aumenta aproximadamente 8 veces y la capacidad de síntesis de porfirinas se incrementa también significativamente.

Evidentemente parecería existir un bloqueo en la síntesis de δ-ALA.

iii) Proplástido III : se asemejan a los anteriores, con la excepción de que son capaces de sintetizar porfirinas en la luz sin agregado de δ-ALA. Este tipo está representado por los plástidos de la cepa B6In7W, blanqueada espontaneamente.

Por lo tanto, elcamino biosintético de las porfirinas parecería funcionar normalmente hasta la formación de protoporfirinas, pudiendo existir un bloqueo en los últimos pasos de la síntesis de la clorofila.

iv) Proplástido IV: los representantes de esta clase son los plástidos de célu

/las normales crecidas en la oscuridad. Son morfológicamente idénticos a los proplástidos presentes en células blanqueadas y cuando se exponen a la luz,su tamaño y contenido de carotenoides aumenta y se enverdecen.

La presencia de esta variedad de cepas con proplástidos morfológicamente similares pero con daños biosintéticos decrecientes, permite la identificación de estas organelas como plástidos modificados.

Gibor y Granick (1962) concluyen, por lo tanto, que los plástidos no desaparecen cuando las células de Euglena son tratadas con estreptomicina,luz U.V., temperaturas elevadas o cuando pierden espontáneamente su capacidad de enverdecimiento.

En realidad el primer trabajo que se encuentra en la literatura que estudia específicamente la síntesis de porfirinas por cloroplastos aislados de Euglena, es de Carell y Kahn y data del año 1964; en el cual demuestra que los cloroplastos aislados son capaces de sintetizar PBG a partir de δ-ALA. La actividad de estas organelas, purificadas por una metodología sumamente complicada, representaba mas del 20 % de la actividad total de homogenato; ni una mayor purificación, ni la ruptura total de los cloroplastos, liberaba dicha actividad, indicando que la enzima ALA-dehidrasa estaba fuertemente unida a la membrana plástida.

Por otro lado, los cloroplastos purificados, incubados con δ-ALA, eran capaces de formar uro y coproporfirina, pero no protoporfirina; sin embargo, si se incubaba con PBG, no sintetizaban porfirinas. En cambio los cloroplastos rotos,incubados ya sea con ALA o PBG, formaban diferentes porfirinas incluyendo copro y protoporfirina. Por lo tanto, a partir de estos resultados, los autores concluyen que los cloroplastos de E. gracilis son impermeables al PBG, planteando la posibilidad de la existencia de una compartimentalización enzimática en su interior.

De acuerdo con la hipótesis sobre el control de la síntesis de protoporfirina (Sano y Granick, 1961), el ácido δ- ALA se forma en la mitocondria y pasa al citoplasma para ser convertido, luego de una serie de etapas, en coprógeno, el cual migra nuevamente hacia la mitocondria para ser transformado en PROTOPORFIRINA.

O sea, esta compartimentalización permitiría un control en la síntesis de porfirinas, en base a un fenómeno de permeabilidad.

Si bien este mecanismo funcionaría para la síntesis de porfirinas citoplasmáticas, según Carell y Kahn no puede dejarse de lado la posibilidad de que en aquellas células que poseen cloroplastos estén presentes dos sistemas para la regulación de la síntesis de porfirinas funcionando simultáneamente, lo cual representaría una forma adicional de asegurar la economía celular.

No descartan tampoco la alternativa de que el δ- ALA usado por los cloroplastos sea sintetizado en la mitocondria, puesto que no estudiaron direc

tamente la síntesis del mismo por los cloroplastos aislados.

Finalmente Carell y Kahn (1964) concluyen que el hecho de que los cloroplastos posean cierto grado de autonomía, lo cual ya había sido demostrado, estaría de acuerdo con su hipótesis que estas organelas contienen su propio mecanismo para la formación de porfirinas o clorofila y que por su compartimentalización interior pueden controlar la síntesis de éstos compuestos. Como ya se sabe desde el siglo pasado, el hierro es esencial para la síntesis de clorofila.

Una hipótesis aparentemente lógica y razonable, es que este elemento intervenga en la conversión de coprógeno a protoporfirina, como había sido propuesto por diferentes autores (Lascelles, 1956; Townsley y Neilands, 1957). Esta hipótesis tuvo su orígen en los trabajos pioneros de Pappenheimer y Johnson (1937), quienes encontraron que el Fe era esencial para la producción de toxinas por el Corynebacterium diphteriae. En un medio deficiente de hierro, este microorganismo aparentemente desarrollaba una lesión metabólica entre coproporfirina y protoporfirina, acumulando por lo tanto,grandes cantidades de coproporfirina; este mismo comportamiento se encontró posteriormente en otros microorganismos. Evidentemente, una lesión en el camino biosintético de las porfirinas, afectaría también la síntesis de clorofila; ya que como habían puntualizado Granick y Mauzerall (1961), los porfirinógenos son los precursores de la clorofila.

Karali y Price (1963) estudiaron el requerimiento de Fe del alga protozoo E. gracilis para su crecimiento y la síntesis de clorofila, con el objeto de confirmar o no la hipótesis del coprogen; según la cual la velocidad de síntesis de clorofila, en deficiencia de Fe, estaría limitada por la velocidad de síntesis de PROTO, la cual disminuy cuando es menor el contenido de este elemento.

Este efecto comienza a observarse para un dado valor crítico de la concentración de hierro; que debería ser igual o mayor que el nivel crítico para la formación de clorofila. A bajas concentraciones de Fe (aproximadamente 0-10 mμmoles/mgr N proteico), el crecimiento estaba inhibido; a concentraciones mayores éste era normal; sin embargo, había un rango en el cual el crecimiento era normal pero la síntesis de clorofila estaba significativamente disminuída.

Los autores trabajaron entonces en esa zona para evitar las complicaciones debidas a las consecuencias resultantes de la inhibición del crecimiento.

No encontraron acumulación de copro para ninguna de las concentraciones de Fe empleadas; por el contrario, la velocidad de formación de copro disminuía ligeramente al hacerlo el contenido de Fe.

Por otro lado, las células Fe-deficientes, aunque incapaces de sintetizar clorofila, producían proto a velocidades iguales o mayores que los controles.

Según Kanolí y Prince, es muy poco probable que el Fe esté involucrado en el paso coprógeno ———→ protoporfirina, ya que de ser así, la velocidad de formación de PROTO debería estar disminuída en células deficientes en el metal, lo cual no ocurre, por lo menos en E. gracilis.

En 1965, Carell y Price, empleando E. gracilis Z, trataron de comprobar la validez de esta hipótesis. En un trabajo anterior (Price y Carell, 1964), ya habían demostrado el requerimiento de Fe para el crecimiento de Euglena y la síntesis de clorofila, cuya velocidad estaba linealmente relacionada con el contenido de este metal en la célula. Encontraron además que en el rango de concentraciones de Fe donde el crecimiento no estaba inhibido, la actividad de las enzimas que llevan a la formación de porfirinas, era independiente de la cantidad de Fe en las células, o sea, ALA-D; PBG-asa y la síntesis enzimática de COPRO y PROTO a partir de PBG.

Sólo a deficiencias extremas de Fe que prácticamente inhibían el crecimiento de las células, observaron acumulación de copro y velocidades disminuídas para la formación de PROTO.

Por lo tanto, si bien el Fe puede ser en Euglena un requerimiento para la conversión de coprogen a PROTO, como lo es en muchos otros microorganismos, éste no estaría relacionado con el requerimiento de Fe encontrado para la síntesis de clorofila.

Estos resultados no excluirían la hipótesis del coprógeno, sólo si existiera un sistema independiente para la síntesis de porfirinógenos, precursores de la formación de clorofila; si tal sistema fuese particularmente sensible al contenido de Fe en las células; y si el mismo comprendiera una fracción pequeña (practicamente despreciable) de la producción total de porfirinas.

En efecto, Carell y Kohn (1964) habían encontrado que los cloroplastos aislados de Euglena pueden sintetizar porfirinas; por lo tanto, debe existir un sistema independiente en ellos, pero según Carell y Prince (1965) la actividad de esas organelas parecería comprender una fracción lo suficientemente grande de la producción total de porfirinas como para que se pueda detectar alguna sensibilidad a la deficiencia de Fe.

No obstante, ellos también concluyen que la hipótesis del coprogen, propuesta para explicar el requerimiento de Fe en la síntesis de clorofila, parecería no ser la correcta.

Por otro lado, sabemos que la síntesis de clorofila está bloqueada en la oscuridad, en un paso intermedio, más allá del cual, la presencia de luz puede disparar las reacciones secuenciales que llevan a su formación. Sería lógico entonces, esperar una acumulación de intermediarios y la probable excreción de los mismos al medio de crecimiento, en esas condiciones.

Sin embargo, Aaronso y Bensky (1962), no pudieron detectar en Euglena blanqueada, excreción de porfirina.

En cambio, Dubosh y Repe (1967) reportaron que cultivos en crecimiento activo de E. gracilis, excretaban porfirinas al medio, aún en presencia de luz, y que cuando las células crecían en oscuridad esta excreción aumentaba aproximadamente 13 veces.

Además identificaron espectroscópicamente, que la porfirina excretada era PROTO IX - dimetil éster con su pico característico de absorción a 407 mμ.

Es de hacer notar, que una adaptación prolongada a crecer en la oscuridad resultaba en una menor cantidad de porfirinas presentes en el medio; en estas condiciones se encontraba sólo el doble de la cantidad excretada por células crecidas en la luz.

Estos resultados parecerían indicar que este compuesto podría ser un intermediario directo del camino biosintético de la clorofila; pero Dubosh y Rege (1967) encontraron que esta porfirina metilada agregada a su medio de incubación, inhibía la síntesis de clorofila, en células etioladas de Euglena expuestas a la luz; lo cual sugería que tal compuesto no era un intermediario directo, sino mas bien un producto estabilizado del mismo.

Según los autores otra posibilidad sería que la luz oxidara el dimetil éster de la PROTO y el producto oxidado fuera realmente el responsable de tal inhibición.

Es evidente que esta excreción de PROTO IX - dimetil éster en filtrados de cultivos de Euglena está relacionada con la síntesis de clorofila puesto que ocurre en forma significativa, solo durante la supresión de la misma por crecimiento de las células (potencialmente activas para enverdecer) en oscuridad.

En cultivos blanqueados, en los cuales el bloqueo se encuentra a nivel de la formación de los cloroplastos y por lo tanto, está inhibida la síntesis de clorofila; dicha excreción aumenta significativamente. En definitiva, parecería que la secuencia de reacciones que llevan a la síntesis de clorofila esté posiblemente interrumpida en alguna etapa cercana a la formación de PROTO IX; a pesar que no se puede afirmar aún que este compuesto sea el precursor que se acumula en la oscuridad.

El bloqueo podría encontrarse, por ejemplo, en alguna etapa de la biosíntesis entre PROTO IX y un intermediario tipo feofitina, como ser, protoclorofila, la cual había sido considerada como el precursos que se acumula en la oscuridad por varios autores (Wolken et al. 1955; Wolken y Mellon, 1956; Nishimura y Hizisige, 1959). En 1969, Ebbon y Tait detectaron en extractos de células de E. gracilis, crecidas en presencia y ausencia de luz, una enzima que metilaba la Mg-Protoporfirina (S-adenosilmetionina-Mg-Protoporfirina Metil transferasa), siendo la actividad de las células crecidas a la luz, 2 a 3 veces mayor, que la correspondiente a los organismos crecidos en oscuridad.

Encontraron que la actividad estaba principalmente localizada en la fracción cloroplástica en células verdes y en los proplástidos de las células etioladas; un 15-20 % se hallaba en el sobrenadante de ambos tipos de células.

La enzima particulada está fuertemente asociada a los cloroplastos posiblemente por uniones hidrofóbicas, ya que sólo pudo ser liberada con detergentes.

En general, las enzimas estudiadas en Euglena presentan una localización dual, y en la mayoría de los casos ésta se puede adjudicar perfectamente a una función también doble; por ejemplo, la triosa-fosfato isomerasa que funciona en el ciclo reductivo del carbono en los cloroplastos y en la vía glicolítica en el citoplasma.

Sin embargo, para esta enzima metilante, no se conoce otra función más que la de metilar la Mg-Proto en la síntesis de clorofila, que se lleva a cabo en los cloroplastos.

Por ello, Ebbon y Tait (1969) propusieron que sería muy probable que la enzima se sintetizara en el citoplasma, para posteriormente unirse al cloroplasto y que, por lo tanto, ese porcentaje de enzima soluble podría provenir de un exceso de la misma, o de enzima que aún no estuviera fuertemente unida a los plástidos y por consiguiente se liberara durante el proceso de ruptura celular; descartando la posibilidad de una contaminación citoplasmática, dada la metodología empleada.

Demostraron, además que la síntesis de esta enzima metilante, en contraste con aquellas involucradas en la fotosíntesis, era inhibida completamente por ciclohexímida pero sólo parcialmente por cloramfenicol, indicando que era sintetizado por el sistema ribosomal citoplasmático.

Los estudios que realizaron con respecto a la especificidad de sustrato, indicaron que, en Euglena, la secuencia de reacciones en la síntesis de clorofila, sería la siguiente:

PROTO ⟶ Mg-PROTO ⟶ Mg-PROTO Metil éster

como ya había sido propuesto por Gibson et al. (1963) trabajando con R. spheroides.

Ebbon y Tait (1969) confirmaron la localización intracelular de la enzima ALA-D, demostrada por Carell y Kahn (1964); o sea, la mayor parte de la enzima es soluble, pero una pequeña proporción de la actividad enzimática total se encontraba fuertemente asociada a los cloroplastos. Encontraron además, que en Euglena etiolada la actividad específica de esta enzima es significativamente menor que en células pigmentadas, pero mostraba una distribución similar entre las fracciones soluble y particulada, en ambos tipos de célula.

Hasta ese momento, el ALA-D era la única enzima de este camino biosintético que había sido determinada cuantitativamente y, a pesar que relación

clorofila/hemo es elevada durante el crecimiento en presencia de luz; la relación de las actividades del ALA-D cloroplástica: ALA-D citoplasmática es proporcionalmente baja. Según los autores esta discrepancia podría indicar que la actividad expresada (o desarrollada) por la enzima "in vitro" no corresponda a la actividad real "in vivo" o, alternativamente, que los caminos para la biosíntesis de protoporfirina para los dos productos finales (hemo y clorofila) no sean distintos, lo cual no justificaría la localización dual de la enzima.

Analizaron también, los cambios en la actividad de la enzima al variar las condiciones de crecimiento del cultivo. Por ejemplo, cuando se exponía a la luz células crecidas en la oscuridad en un medio de reposo (no había división celular), la actividad de las 2 enzimas estudiadas aumentaba significativamente. Si, en cambio, las células crecidas a la luz se transferían a la oscuridad, tanto en un medio de crecimiento como de reposo; se producía una disminución inmediata en la actividad de las enzimas; como así también en el contenido de clorofila.

En ambos medios la actividad de la enzima metilante y el contenido de clorofila caían en una forma similar, pero la disminución en la actividad del ALA-D era menor en un medio de crecimiento que en un medio de reposo o mantenimiento. Esto podría deberse al requerimiento, por parte de las células proliferantes, de la enzima para la biosíntesis de hemo.

En la mayoría de los trabajos sobre el tema, se postula que el ALA-S en diferentes sistemas es la enzima limitante, y por lo tanto regulatoria, del camino biosintético del hemo (Granick y Urata, 1963); Lascelles, 1964); no obstante, no se había demostrado aún, actividad de ALA-S en extractos de Euglena.

Trabajos posteriores sugirieron que el ALA-D podría regular también la velocidad de síntesis de porfirinas en algunos organismos (Menon y Shemin, 1967; Muthu Krishnan, Padmanaban y Sarma, 1968). Por lo tanto, basándose en ellos y en los cambios significativos del ALA-D encontrados en Euglena gracilis, indujeron a los autores a postular que, también en este organismo, su actividad podría controlar la síntesis de hemo y clorofila.

En 1974, Hovenkamp-Obbema et al. reportaron los resultados de un estudio sobre ALA-D en células verdes de E. gracilis Z.

La iluminación de células de Euglena heterotróficas (crecidas en la oscuridad) ya sabemos que daba como resultado un rápido enverdecimiento de las células, debido al desarrollo de cloroplastos fotosintéticamente activos, que contenían clorofila.

Esta inducción depende tanto de la síntesis de proteínas plástidas como de proteínas citoplasmáticas, de acuerdo con los efectos inhibitorios del cloramfenicol (Cm) y Cicloheximida (Ch) ya analizados.

En este trabajo, los autores demostraron que la exposición a la luz

de células crecidas en la oscuridad (que no se dividen), deban como resultado un incremento rápido de ALA-D; mientras que la clorofila mostraba un lag en su síntesis.

La actividad de ALA-D aumentaba mas de 5 veces, y este efecto era inhibido por Ch pero no estaba afectado por Cm; indicando entonces, que este enzima era sintetizada en los ribosomas citoplasmáticos; resultado coincidente con el de Ebbon y Tait (1969). También analizaron la localización intracelular del ALA-D encontrando que era una enzima típicamente cloroplástica, puntualizando (o indicando) que su síntesis en el citoplasma no invalida en absoluto su presencia intracloroplástica; ya que se había postulado que ocurre con mucha frecuencia un transporte de proteínas desde el citoplasma a la mitocondria y también a los plástidos.

Sus resultados indicaban que el 96 % del total del ALA-D era soluble, por supuesto dentro del cloroplasto; lo cual no está de acuerdo con los obtenidos anteriormente por otros autores (Carell y Kahn, 1964; Ebbon y Tait,1969) Esta discrepancia se debe según Hoverkamp-Obberna et al., al método de preparación de los cloroplastos; como no pudieron liberar, por sonicación, la actividad aún unida a membrana, Carell y Kahn concluyeron que el ALA-D se encontraba fuertemente asociada a los cloroplastos. Los autores de este trabajo, en cambio, emplearon un método de fraccionamiento superior; obteniendo un porcentaje mayor de cloroplastos intactos, los cuales eran sonicados, encontrándose luego de la centrifugación correspondiente casi el total de la actividad del ALA-D en el sobrenadante.

No investigaron la presencia de esta enzima en las mitocondrias,posibilidad que no descartan; como así tampoco que ambas enzimas cloroplástica y mitocondrial sean la misma proteína.

Sabemos que las células crecidas en la oscuridad pierden los cloroplastos pero contienen en cambio, numerosos proplástidos, los cuales desarrollan en verdaderos cloroplastos por acción de la luz. Estos proplástidos, considerados en un principio como organelas primitivas sin una organización interna, poseen en realidad estructuras bien diferenciadas, como los cuerpos prolamares, tilacoides y ribosomas.

En 1974, Hovenkamp y Stegwee investigaron si estos proplástidos eran funcionalmente activos para la síntesis de proteínas. Según los autores, este problema asumía un gran significado a la luz de la demostración de la presencia, en células de Euglena, crecidas en la oscuridad, de pequeñas cantidades de enzimas típicamente cloroplásticas, como la ribulosa difosfato carboxilasa, la NADP-gliceraldehido-3-fosfato-dehidrogenasa y el ALA-D que, en células verdes se encuentra en gran parte localizada en los cloroplastos.

Demostraron que en células etioladas estas enzimas se encuentran ubi-

/cadas exclusivamente o (al menos para el ALA-D) parcialmente en los proplástidos.

Si las células eran cultivadas, durante un cierto número de generaciones, en la oscuridad, y en presencia de cloramfenicol, la síntesis de la ribulosa difosfato carboxilasa y la NADP-gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa, estaba inhibida;sin embargo la síntesis del ALA-D no se afectaba.

Estos resultados indicaban claramente, que en la oscuridad los ribosomas de los proplástidos son capaces de sintetizar proteínas.

En este caso la síntesis de la ribulosa difosfato carboxilasa y de la NADP-gliceraldehido-3-fosfato-dehidrogenasa depende de la síntesis proteíca en los proplástidos.

En cambio, las evidencias experimentales sugieren que la enzima ALA-D, sería aparentemente sintetizada en los ribosomas citoplasmáticos y luego incorporada (aunque sea parcialmente) en los proplástidos o cloroplastos según se trate de células verdes o etioladas.

La conclusión mas importante de este trabajo es que en E. gracilis los proplástidos representan un estado avanzado de diferenciación, compartiendo con los cloroplastos la capacidad de: síntesis de enzimas plástidas típicas y de incorporar enzimas de orígen citoplasmático, necesarias para la síntesis de los constituyentes cloroplásticos, como por ejemplo la protoclorofilida. Inclusive los autores sugieren que sería apropiado reemplazar el nombre proplástido por el término "etioplastos" para estas estructuras.

En 1977, Stella de Rosellini reportó los resultados de un amplio estudio sobre la enzima ALA-D en E. gracilis Z. Según estos trabajos, la actividad del ALA -D fue mayor para el tejido crecido en la luz que en la oscuridad; dependiendo además del número de días de crecimiento, siendo máxima al día 7 para ambas condiciones de iluminación. Se observó una correlación directa y lineal entre el aumento de actividad y la cantidad de clorofila hasta el séptimo día; sugiriendo la existencia de sitios intracelulares y mecanismos de control comunes, operativo durante el desarrollo de la enzima y de las clorofilas.

De un estudio comparativo entre ambos polvos cetónicos obtenidos de tejido fresco de Euglena, crecida en la luz y ést mismo, se vio que era posible y conveniente partir de los primeros, como fuente de obtención de enzima, entre otras ventajas se evitaban los problemas de contaminación por los pigmentos.

En concordancia con las observaciones de Carel y Kahn (1964) se encontró que el 80% de la actividad del ALA-D estaba localizada en la fracción soluble y el resto en la particulada.

En cuanto a las condiciones óptimas de incubación y algunas propiedades de la enzima; como en la mayoría de los casos estudiados, se obtuvo una máxima actividad incubando en anaerobiosis y en presencia de un tiol; la acti

/vidad depe..dió finalmente de la ca.cidad de proteina y tiempo de incubación, pH óptimo fue de 8,0; pero a diferencia con otras Dehidrasas, la enzima de Euglena gracilis no es termoestable, su temperatura óptima es de 37°C inactivándose a mayores temperaturas.

Un estudio de las curvas de saturación de sustrato, mostró que la preparación obtenida de tejido fresco, exhibía un comportamiento fuera de lo común, y si se calculaban los n de Hill, aparecían dos valores para n, uno tendiente a 2 y el otro menor que 1. Sin embargo, cuando se partía de polvo cetónico, si bien el gráfico de las directas no llegaba a saturación tampoco, el n = 1; aún así, en ambos casos el Km aparente es de 2×10^{-4} M, un valor dentro del orden reportado para ALA-Dehidrasas de otras fuentes.

El intento de la purificación del ALA-D en Euglena gracilis por los métodos convencionales, no dio los resultados esperados desde el punto de vista del grado total de purificación; sin embargo, además de tener una posible explicación, lo interesante fue que el análisis de los perfiles de elución de las fracciones 25-45 % de sulfato de amonio a través de columnas calibradas para la determinación de pesos moleculares, de Sepharosa 4B, permitió hacer algunas interpretaciones atractivas tales como la existencia de distintas especies moleculares de ALA-D de E. gracilis, en equilibrio; con una de Peso Molecular de 280.000 que correspondería a la enzima nativa, catalíticamente mas activa, probablemente un octámero, acompañada de tetrámeros o dímeros en menor y diferente proporción, según el orígen de la enzima, y una muy pequeña cantidad de un decámero.

Del estudio de la acción de ciertos quelantes, se confirmó la suposición de que probablemente algún metal divalente estaría involucrado en la actividad de la enzima, lo cual llevó a investigar el efecto "in vitro" e "in vivo" de algunos cationes. Se vió que Mg, Mn y NH_4^+ activaban el ALA-D "in vitro". otros metales no tenían efecto.

Se observó en cambio, que había cierta dependencia en la actividad del ALA-D de la concentración de Fe y Zn en el medio de cultivo, siendo máxima a 10^{-7}M de Fe y 10^{-4}M de Zn; sin embargo estos mismos metales no tenían acción alguna "in vitro".

De un estudio combinado de metales e inhibidores de la síntesis de proteínas, "in vivo", se postuló que el efecto de los primeros, no sería sobre la síntesis de nueva proteína sino una activación de la enzima en formación.

Mediante el empleo de determinados inhibidores de la síntesis de proteínas, se confirmó que el sitio de biosíntesis en ALA-D de E. glacilis sería citoplasmático, la cual se transfería luego a los plásticos, durante el desarrollo de los cloroplastos. Aparentemente, el turnover de la enzima "in vivo" sería de 4-5 horas; aunque cuando se empleó tejido activado por metales se obtenía un perfil bifásico, que sugería la existencia de dos componentes, uno de ellos normal, y el otro con una vida media mucho menor.

Se confirmó la naturaleza sulfhidrílica de la enzima y el efecto inhibitorio de algunos metabolitos finales del camino del hemo.

Mediante la aplicación de las técnicas de inmovilización de ligandos, se prepararon varios absorbentes bioespecíficos diferentes para el ALA-D, que resultaron significativamente eficientes para la purificación del ALA-D por cromatografía de afinidad. En una sola etapa se logró purificar la enzima proveniente de E. gracilis o de hígado bovino, entre 20 y 40 veces.

En vista de la posible obtención de cantidades relativamente grandes de enzima pura, se llevaron a cabo estudios sobre el ALA-D insolubilizada, determinándose las condiciones óptimas de acople y estudiándose comparativamente las propiedades de la enzima soluble e inmovilizada sobre Sepharosa.

Por último, empleando el ALA-D insolubilizada, se llevó a cabo un estudio de sus subunidades inmovilizadas sobre Sepharosa. Como resultado de estos estudios, se propuso un modelo, según el cual, la Sepharosa-ALA-D octámero, estaría unida a la matriz por dos subunidades; el tratamiento con distintas concentraciones de urea disociaría tetrámeros o dímeros, estas subunidades disociadas son capaces de re-asociarse, eliminando el agente disociante, regenerando un octámero activo funcional soluble; en tanto las subunidades insolubles son también capaces de re-asociarse o re-hibridizarse con subunidades aisladas generadas in situ, también reconstituyendo el octámero nativo insolubilizado original.

Se postuló también, que la estructura funcional mínima del ALA-D bovina, y posiblemente de todas las dehidrasas, es un dímero, constituído por dos subunidades similares pero que juegan un papel diferente en la síntesis del monopirrol PBG.

Asimismo, se propuso un esquema para explicar el mecanismo de acción del ALA-D, que ya ha sido comentado al referirnos con anterioridad, a las enzimas del hemo.

Richard y Nigon (1972, 1973) estudiaron la síntesis del δ-ALA y clorofila, durante el enverdecimiento de E. gracilis etioladas. En su primer primer trabajo, en el año 1972, demostraron que la síntesis de clorofila depende por supuesto, de la capacidad para sintetizar δ-ALA; sin embargo, éste se puede sintetizar en la oscuridad, cuando cesa la producción de clorofila. Según los autores, estos resultados sugerirían la existencia de otros controles en la producción de clorofila.

En cambio, la síntesis de δ-ALA, parecería estar regulada por varios mecanismos:

i) uno que funcionaría en la oscuridad y no sería afectado por un período de 4 horas en ausencia de luz.

ii) un segundo mecanismo que dependería dela presencia de luz y deja-

/ría de funcionar luego de 25 minutos de oscuridad, siendo luego restablecida en presencia de luz.

iii) un tercer sistema que se pondría en evidencia en presencia de luz y luego del agregado de 3-(3,4-diclorofenil)-1, 1-dimetilurea; reemplazaría al segundo sistema y llegaría a un equilibrio mas rápidamente en cultivos que han sido constantemente iluminados, que en aquellos en los cuales la exposición a la luz ha sido interrumpida por períodos de oscuridad.

En un trabajo posterior estos mismos autores (1973) confirmaron y ampliaron estos resultados. Las conclusiones a las cuales llegaron, luego de un extenso y profundo estudio fueron las siguientes:

i) La adición de ácido levulínico, inhibidor competitivo del ALA-D a células de Euglena que están enverdeciendo frena temporariamente la síntesis de clorofila y produce la acumulación de δ-ALA. La cantidad de δ-ALA acumulada luego de 30 minutos de la adición del inhibidor, es estequiométricamente equivalente a la clorofila producida en las células controles durante el mismo período de tiempo (con un error de $\pm$ 10 %)

ii) En presencia del inhibidor, las células etioladas de Euglena, producen una pequeña cantidad de δ-ALA.

Si células verdes se transfieren a la oscuridad, la síntesis de δ-ALA disminuye, progresivamente, hasta que cesa completamente a los 20 minutos. De acuerdo a estos resultados, la síntesis de δ-ALA en Euglena, parecería mostrar una dependencia indirecta con la luz, sin necesitar obligatoriamente, la provisión de energía luminosa.

iii) El agregado de δ-ALA no aumenta la producción de clorofila excepto durante la fase terminal del enverdecimiento, cuando las reservas celulares son prácticamente nulas.

Por lo tanto, la síntesis de clorofila parecería estar regulada por una limitación de los precursores del ácido δ-ALA ó por una limitación en los últimos pasos de la síntesis, de acuerdo con el estado de enverdecimiento. En este último caso, la producción de δ-ALA estaría controlada por un mecanismo feed-back.

iv) Los resultados obtenidos por Richard y Nigon los llevaron a postular que la síntesis de δ-ALA y de sus precursores en E. gracilis estaría sujeta a, por lo menos 3 mecanismos de control :

i) El primero de ellos estaría relacionado con el crecimiento de las células en la oscuridad;

ii) Un segundo mecanismo que dependería de una activa fotosíntesis y que puede bloquearse por DCMU y

iii) Un tercer sistema, que no sería afectado por el inhibidor de la fotosíntesis, DCMU, y por lo tanto, solo dependería de la presencia de luz, pero no de una fotosíntesis activa. Esta mecanismo de control sería efectivo

al comienzo del enverdecimiento y dejaría de funcionar antes de finalizar éste.

Además, demostraron que la síntesis del δ- ALA puede estar limitada por factores relacionados con la cantidad y movilización de las reservas celulares.

En un trabajo reciente Salvador (1978), demostró que cloroplastos aislados de E. gracilis Z, son capaces de sintetizar δ-ALA marcado, a partir de 1,2^{14}C- α -cetoglutarato y 2,4-^{14}C-glutamato.

La cantidad de δ-ALA producida, aumentaba linealmente con el tiempo de incubación y era menor en ausencia que en presencia de luz; Richard y Nigon.

La cantidad de δ- ALA producida por los cloroplastos "no lavados" era mayor que la formada por cloroplastos "lavados", sugiriendo que el lavado podría eliminar algún componente indispensable para su síntesis o provocar alguna alteración estructural en los cloroplastos de tal forma que se modificara su actividad.

Purificaciones posteriores de los cloroplastos lavados no alteraban la marca obtenida, indicando la ausencia de contaminantes. También estudiaron la influencia de los distintos componentes del medio de incubación sobre la producción de δ- ALA; encontraron que aquellos cuya ausencia disminuye la actividad de la enzima eran: ATP, fosfato de piridoxal y metanol; en cambio si no se incorporaba CoA y glutation reducido, ésta no se modificaba.

Los resultados descriptos demuestran que las preparaciones de los cloroplastos de Euglena poseen efectivamente el "equipo" biosintético para la formación de δ-ALA.

Finalmente, el autor sugiere que, si bien no puede descartarse la presencia de contaminaciones mitocondriales, éstas son lo suficientemente bajas (aproximadamente un 5 % de los cloroplastos lavados) como para considerar que aportan a la elevada y activa producción del ácido δ- ALA.

.- ALGO MAS SOBRE LA BIOSINTESIS DE CLOROFILA

.1.- Las últimas etapas de la síntesis. Identificación del precursor directo de la clorofila.

Se encuentran en la literatura numerosos trabajos con el objeto de identificar el precursor inmediato de la clorofila, pigmento responsable del color verde de las células de Euglena yque desaparecen luego de varias generaciones de crecimiento en la oscuridad, reapareciendo cuando éstas células etioladas se exponen nuevamente a la luz. Determinaciones del espectro de acción para este proceso, han sugerido que el precursor de la clorofila es la protoclorofila (Wolken et al., 1955; Wolken y Mellon,1956; Wolken, 1961; Nishimura y Huzisige, 1959).

No obstante, como puntualizaron mas tarde Epstein y Schiff (1965), debido a que aún no estaba realmente bien determinado en Euglena, cual era el verdadero precursor de la clorofila, la protoclorofila o protoclorofilida, propusieron temporariamente el empleo del término "protoclorofila(ida)" que hemos empleado hasta ahora, para denominar al precursor de la clorofila.

En 1966, Butter y Briggs estudiaron la influencia de la estructura sobre los cambios espectrales, que ocurrían durante el enverdecimiento en células etioladas deE. glacilis para producir los cambios estructurales en los proplástidos, emplearon la técnica de congelamiento a 77°K y descongelamiento u homogeneización con arena y buffer.

Encontraron un máximo de absorción para la protoclorofila(ida) a 630nm, e inmediatamente después de la fotoconversión la banda de absorción para la clorofila (ida) se desplazaba a 677 nm. El congelamiento y descongelamiento no alteraba la posición de estos máximos; estas observaciones parecían sugerir que en Euglena, la clorofila recien sintetizada es monomérica, formada a partir de una clorofila(ida) también monomérica.

Si células de Euglena, crecidas en oscuridad y en reposo, se exponen a luz blanca contínua, presentan un período lag, de 10 a 12 horas según los autores, posterior a la conversión inicial de la pequeña cantidad de protoclorofila(ida) a clorofila y previo al comienzo de un período de síntesis rápida y acumulación de la misma (Brawerman y Chargaff, 1959 ; Nishimura y Huzisige, 1959; Stern et al. 1964 a). Durante este período lag, practicamente no hay formación de clorofila, si la hay su velocidad es muy baja; la mayor acumulación ocurre desde el momento en que comienza a sintetizarse a su velocidad máxima, aproximadamente a las 12 horas, hasta que se completa el desarrollo del cloroplasto, entre las 70 y 80 horas de iluminación.

Stern et al.(1964 a) trabajando con E. gracilis var. bacillaris, etiolada demostraron que la cantidad de clorofila formada luego de dos horas de exposición a la luz, no era estequiométrica con el contenido del precursor en las células, puesto que el contenido de clorofila a las dos horas representaba un aumento de 10 veces. Por lo tanto, sugirieron que, luego de la síntesis inicial de clorofila, se formaría mas protoclorofila(ida) que a su vez se convertiría en clorofila (lo cual está de acuerdo con la inhibición por feedback a la que ya nos hemos referido); la síntesis de clorofila procede entonces muy lentamente hasta aproximadamente las 10 horas, que es cuando ellos encuentran una síntesis significativa de clorofila.

Brody et al. (1965) en un estudio similar con E. gracilis Z., también observaron un marcado aumento en el contenido de clorofila a las 10 horas,aunque en algunos casos, encontraron períodos tan cortos como de 2 horas.

Con el objeto de comparar sus resultados con los obtenidos por Stern

/et al. (1964 a), midieron la fase lag en la var. bacillaris, encontrando períodos mucho mas largos, siendo el máximo hallado de 25 horas.

Por lo tanto, propusieron que estas diferencias podrían reflejar la existencia fisiológica, entre las distintas cepas, más importantes que las morfológicas que puedan presentar.

A pesar que algunos autores consideran que no existe ninguna relación entre el tiempo de duración de este lag y el proceso de fitilación; Brody et al. (1965) reportaron que el valor de este período, para E. gracilis Z coincidía aproximadamente con el tiempo requerido para dicha reacción.

Los primeros eventos que pueden detectarse cuando finaliza este período lag son: la conversión de protoclorofila(ida) a clorofila(ida) (Nishimura y Huzisige, 1959); Schiff et al., 1961); un gran incremento en la velocidad respiratoria (Schiff, 1963) y la formación de membranas cloroplásticas; todos procesos relacionados con la inducción por la luz (Ben-Shaul et al. 1964; Schiff y Epstein, 1965).

De acuerdo con Stern et al. (1964 a) quienes siguieron la cinética de aparición y desarrollo de la clorofila, carotenoides y fotosíntesis (medida como evolución de O_2 e incorporación de $^{14}CO_2$), estos procesos mostraron una velocidad esencialmente lineal hasta aproximadamente las 80 hrs., luego de lo cual se llegó a un estado estacionario.

Al finalizar la fase lag, que se extendía hasta las 10 hrs. de iluminación a 100-150 ft-c, las células crecidas en la oscuridad tenían sus primeras lamelas (se considera que la primera lamela ya está organizada a las 24 horas, momento en el cual también comenzaría la evolución neta de O_2 y la fijación de CO_2); luego la velocidad de formación de las lamelas era paralela a los fenómenos ya descriptos; a las 80 hrs. los cloroplastos habían completado su desarrollo (Ben-Shaul et al., 1964 a; Stern et al., 1964 a,b).

A las 10 hrs. de desarrollo ya se podía medir perfectamente la evolución de O_2; por lo tanto, sugirieron que, probablemente el proceso fotosintético comenzaría un cierto tiempo previo a la finalización de la fase lag.

Brody et al. (1965), consideró que el desarrollo del aparato fotosintético funcional de E. gracilis Z, comenzaba luego de 5 a 10 hrs. de iluminación.

Ahora, teniendo en cuenta que las células ya tienen cierto contenido de clorofila antes de este tiempo, varios autores se han planteado el interrogante de por qué las células son incapaces de fotosintetizar en un período mas temprano.

Krinsky et al. (1964) intentaron explicar este fenómeno como debido a una necesidad de la neoxantina, que recién aparece a las 4 horas de iluminación, para el comienzo de la fotosíntesis; pero muchos autores consideran que este pigmento simple, igual que los otros carotenoides, un rol indirecto relacionado con el proceso fotosintético, como ya hemos descripto.

Brody et al. (1965) confirmaron las observaciones de Stern et al. (1964 a, b), y reportaron además que aproximadamente a las 10 hrs. se producía un aumento brusco en la fluorescencia encontrada e longitudes de onda largas (~ 720 mm) a expensas de un decremento de la otra banda (~ 685 nm)

Según ellos la fluorescencia a 685 nm correspondía a especies monoméricas (F_n) por lo tanto concluyeron que en células de E. gracilis que han enverdecido en menos de 10 hrs se encuentra presente un pequeño agregado de moléculas de clorofila y destacaron que ya ellos habían observado con anterioridad que la presencia de estos agregados era una condición necesaria para la fotisíntesis.

En 1966 Aghion reportó que E. gracilis "in vivo" contiene 3 tipos principales de complejos de clorofila, los cuales definió en base a su absorbencia espectral: uno absorbe a 67 mμ, otro a 730-740 mμ y un tercero que no tiene máximo en el rango visible del espectro. El blanqueamiento de las células de Euglena, según este autor, se debería a una transformación reversible de todos estos complejos en sus formas incoloras, seguidas por una lenta destrucción de la clorofila.

Debido a que este precursor se encuentra en muy baja concentración en las células etioladas de Euglena la presencia de grandes cantidades de contaminantes, fundamentalmente ácidos grasos, en los extractos que contienen pigmentos, su aislamiento y purificación es extremadamente difícil. Es por estas razones que los pigmentos precursores de la clorofila en este organismo, no habían sido aislados en cantidad suficiente para la determinación de su espectro de absorción y otras propiedades, incluyendo si están esterificados o no.

Recién en 1976, Cohen y Schiff reportaron la separación y purificación de estos pigmentos, empleando una técnica bastante compleja que incluía una serie de extracciones y cromatografías en papel. Estos autores demostraron que en Euglena, como en las hojas jóvenes de plantas superiores, se encuentran los protopigmentos, protoclorofilida(Pchlida) y protoclorofila(Pchl) en cantidades aproximadamente iguales.

En las plantas superiores los niveles de los protopigmentos aumentan en varios órdenes de magnitud durante el desarrollo de las hojas en la oscuridad pero, en Euglena permanecen prácticamente constantes durante el crecimiento en la oscuridad. Esto es de esperar puesto que las hojas jóvenes de las plantas superiores tienen protoplástidos bastante simples como Euglena, y mientras los proplástidos se desarrollan en etioplastos mucho más complejos la morfología de los protoplástidos de las células de Euglena permanece invariable durante el crecimiento prolongado de éstas en ausencia de luz.

Sus resultados indican que tanto la Pchl como la Pchlida se convierten directamente en sus pigmentos respectivos Chl(ida), por acción de la luz.

La naturaleza del alcohol esterificante en Euglena aún no se conoce

/el 10-50 % de los protopigmentos presentes son fotoconvertibles a clorofila (Chl); estos porcentajes tan bajos son característicos de las hojas jóvenes etioladas.

En general, todas las propiedades que estos autores observaron y que son características de la fisiología de la Pchl (ida) y Chl(ida) y del desarrollo de los cloroplastos de Euglena, se encuentran también en las hojas jóvenes (2-3 días), etioladas de las plantas superiores y son totalmente diferentes de las que presentan las hojas viejas de estas plantas.

Por lo tanto, esto sugiere que el sistema sintetizante de clorofila de Euglena se asemeja al encontrado en hojas jóvenes de poroto.

XIII.3.2- Algo más sobre la fase lag en la síntesis de clorofila y su regulación.

En 1970, Holowinsky y Schiff, reportaron los efectos de una preiluminación sobre el desarrollo de los cloroplastos y síntesis de clorofila en cálula de E. gracilis etioladas.

La preiluminación, seguida de un período deoscuridad, previo a la exposición de células etioladas no proliferantes, de E. gracilis, en condiciones normales de iluminación para el desarrollo del cloroplasto, resultaba en una potenciación, o supresión del lag normal en la acumulación de clorofila.

El grado de potenciación es una función de : la duración del período de preiluminación, la intensidad de la luz con la que se lleva a cabo esta preiluminación y la duración del período de oscuridad que se interpone antes de la reexposición a luz continua para el desarrollo.

Encontraron que las condiciones optimas son: 90 minutos de preiluminación con luz blanca a una intensidad mayor que 30 microwatts por cm2 (11 ft-cd); seguida por un período dé oscuridad de, por lo menos 12 horas.

No hallaron reciprocidad entre la duración y la intensidad de la luz con que se preilumina.

La preiluminación con luz azul y roja eran las mas efectivas para inducir la potencialidad y la relación de eficiencia de luz azul a la verde y a la roja era consistente con la hipótesis de que el fotorreceptor es la protoclorofila(ida).

A pesar que la luz roja era efectiva, no había reversión por luz roja lejana; y estos hechos, sumados a la eficiencia de la luz azul, sugerían que en este proceso no estaba involucrado el fitocromo.

En las plantas superiores,varios autores demostraron que la síntesis enzimática de la protoclorofila(ida) es activada por el fitocromo. Boutin y Klein (1972) estudiaron el efecto de la irradiación con luz roja sobre la síntesis de clorofila; las células se iluminaron durante 15 minutos con suficiente luz roja (1,14 joules/cm2) como para convertir completamente el fitocromo a su forma Pfr. luego se siguieron iluminando las células con luz blanca fluorescente.

La preiluminación con luz roja no tenía efecto sobre el número de células o sobre la concentración de clorofila por célula; los mismos resultados se obtuvieron en un medio de reposo.

También estudiaron el efecto de potenciación descripto antes, para lo cual se expusieron células crecidas en la oscuridad, a luz roja por 15 minutos, luego se colocaron en la oscuridad durante 12 horas y finalmente, se iluminaron con luz blanca contínua. Bajo estas condiciones, no había un efecto de potenciación estadísticamente significante y ni sobre el número de células ni sobre la concentración de clorofila por célula.

Finalmente, para completar sus estudios Boutin y Klein, iluminaron células etioladas, primero con luz roja por 15 minutos e inmediatamente los 15 minutos siguientes con luz roja lejana (1,5 joules/cm^2). A pesar que encontraron un ligero aumento en el contenido de clorofila por célula en poblaciones tratadas con luz roja y una disminución en la síntesis de clorofila en células tratadas con luz roja lejana las diferencias observadas no eran estadísticamente significativas. Por lo tanto Boutín y Klein, confirmaron la hipótesis de Holowinsky y Schiff de que el fitocromo no debe estar involucrado en la síntesis de clorofila en Euglena. Estos últimos autores también demostraron que la clorofila formada al finalizar la preiluminación es proporcional a la potenciación resultante, sugiriendo que la cantidad de protoclorofila(ida) desaparecida o de clorofila(ida) formada regula este fenómeno. Tanto las células potenciadas como las no potenciadas, mostraron velocidades de resíntesis de protoclorofila(ida) comparables, sugiriendo que éste no es el factor limitante en las células no potenciadas.

Además, a pesar que se requiere la presencia de luz para la conversión de protoclorofila(ida) en la síntesis de clorofila, una breve preiluminación pareciera iniciar también la producción de componentes en el período de oscuridad siguiente, lo cual, en células no-potenciadas, se sintetizan generalmente, durante el período lag. en condiciones de iluminación. Estos componentes son necesarios para mantener velocidades máximas para la acumulación de clorofila subsiguiente.

Podemos definir entonces el proceso de potenciación como aquel por el cual se suprime la fase lag en la síntesis de clorofila y que tiene lugar cuando el organismo recibe luz durante un período corto, seguido de una fase de oscuridad.

La duración de ambas fases que dan una respuesta de potenciación máxima es diferente para las plantas superiores, Clamydomonas o Euglena. Freyssinet (1976) demostró que la longitud de la fase lag para la síntesis de clorofila en Euglena, variaba dependiendo del medio usado para el crecimiento en la oscuridad. El periodo lag es inversamente proporcional al contenido de paramilon en el momento de la iluminación, disminuyendo hasta un mínimo de 2 a 3 horas para la cepa Z y de 3 a 4 hrs. para la var. bacillaris

En 1976, el mismo Freyssinet, reportó sus estudios sobre la influencia que tenía el medio de cultivo sobre la duración o longitud de la fase lag

en células etioladas de Euglena gracilis Z preiluminadas o sea potenciadas.

Fundamentalmente, se determinó dos parámetros del proceso de potenciación, la duración de la preiluminación y de la fase oscura subsiguiente, en células crecidas en la oscuridad en dos medios diferentes: PC_1 que inducía primero una deficiencia en fósforo y luego en carbono y CN_1 que inducía una deficiencia de crecimiento primero en carbono y luego en nitrógeno.

Observó que el proceso de potenciación ocurría siguiendo una función sigmoidal, llegándose a un plateau aproximadamente a las 2 horas de iluminación. Para los cultivos PC_1 se llegaba en algunos casos, a este plateau luego de 1,5 horas de iluminación.

Además la duración de la fase de post iluminación no tenía ninguna influencia en la forma de la curva que representaba el fenómeno; se obtenían los mismos resultados luego de diferentes tiempos de post iluminación.

Una vez finalizada la pre-iluminación y transferidas las células a la oscuridad, se produce un pequeño e inmediato incremento en la síntesis de clorofila. Para los cultivos PC_1 este período era de apenas 10 minutos, en cambio para los cultivos CN_1 era de 30 minutos; el plateau se alcanzaba luego de una hora de oscuridad para PC_1 y luego de 6 horas para los cultivos de CN_1. Nuevamente, en este caso se obtenían las mismas curvas cualquiera que fuera el momento en que se sacaran las muestras.

Por lo tanto las conclusiones que se pueden obtener comparando los resultados obtenidos en ambos casos:

i) El tiempo de duración óptimo de pre-iluminación estaba siempre al rededor de las dos horas; cualquiera fuese el medio y/o cepa empleada y era mucho más largo que el necesario para plantas superiores; esta diferencia puede deberse a la pérdida del sistema fitocromo en Euglena.

ii) Por el contrario, la duración óptima del período de oscuridad se modifica significativamente según el medio de crecimiento y la cepa. Aumenta cuanto mayor es la fase lag en la síntesis de clorofila (según la cepa) y cuando disminuye el contenido de paramilón.

iii) Para los cultivos PC_1, la longitud de la base lag en la síntesis de clorofila es aproximadamente la suma: preiluminación + fase oscura. Para los cultivos CN_1 la duración de la fase lag es generalmente menor que esta suma.

El fenómeno de potenciación se puede dividir entonces en dos fases:
1) Una fase de inducción que requiere la provisión de energía luminosa y cuya intensidad aumenta con el tiempo de duración de la pre-iluminación hasta que se alcanza el máximo luego de 1,5 a 2 horas de luz. Este período no parece ser sensible a la historia nutricional previa de las células.; requiere oxígeno (Klein et al, 1972) y puede ser inhibido, por cicloheximida, cloromfenicol (Schwartzboch y Schiff, 1971) y ácido levulínico (Schwartzboch et al, 1974). La independencia de este periodo con respecto a la cantidad de reservas disponibles, indica que su función principal debe ser la síntesis de productos en pequeñas cantidaddes. Su duración podría entonces corresponder al período de tiempo necesario, o bien para acumular una cantidad suficiente de uno o varios productos específicos o bien para llevar a cabo eventos secuenciales en todas las células del cultivo.
2) Una fase de desarrollo que puede tener lugar tanto en presencia como en ausencia de luz; corresponde a la actividad de un período fotoinducido. Sus efectos se extienden en el período de oscuridad hasta que se alcanza un máximo, entre 1 y 12 horas, luego de finalizada la pre-iluminación.

Este período puede ocurrir en ausencia de oxígeno (Klein et al, 1972) es sensible, por lo menos durante una parte del período de oscuridad a cicloheximida, cloramfenicol (Schwartzbach y Schiff, 1971) y ácido levulínico (Schwartzbach et al, 1974); es también sensible a las condiciones nutricionales empleadas para el cremiento previo en la oscuridad.

Las reservas de carbohidratos que parecerían ser la diferencia principal entre ambos tipos de cultivo, podrían jugar un rol en el control de la duración de esta fase. Esta relación entre la cantidad de carbohidratos de reserva y la longitud de este período indicarían que, en contraste con la fase de inducción, en esta etapa de desarrollo se estarían sintetizando probablemente grandes cantidades de producto.

En 1975, Hovenkamp-Obberna reportó los resultados de los efectos que tenía el agregado de ácido δ-ALA sobre la síntesis de lorofila. Stern et al (1964a) habían encontrado que la iluminación de células etioladas, inducía el desarrollo de los proplástidos en cloroplastos, proceso que como ya sabemos, involucra la síntesis de clorofila y que presenta un lag de aproximadamente 10 horas.

En 1968 Kirk reportó que en células de E. gracilis Z en enverdecimiento había un aumento de 3 veces en la síntesis de clorofila luego del agregado δ-ALA.

Sin embargo, los resultados de Hovenkamp-Obberna desmostraron que la síntesis de clorofila no se estimulaba por el agregado exógeno de δ-ALA. Por el contrario, parecería que en células en las cuales las reservas han disminuído, la síntesis de δ-ALA puede ser limitante, en aquellos períodos en los cuales tiene lugar una rápida síntesis de clorofila.

Por lo tanto, el δ-ALA no es el factor regulatorio en la síntesis de clorofila, en células en envérdecimiento; sin embargo, si las células se mantienen en la oscuridad por un período de tiempo largo, el ácido δ-ALA podría llegar a ser un factor regulador en la síntesis de clorofila.

Según el autor ésto puede interpretarse considerando que en estas células algún sustrato, como por ejemplo la SuccinilCoA sea limitante para la síntesis de clorofila. Otra posibilidad sería que se produzca un "agotamiento" de la enzima, ya que la vida media del ALA-S en distintos organismos es generalmente muy corta.

Beale (1971), trabajando con Chlorella, llegó al mismo resultado, o sea que el δ-ALA era incapaz de estimular la síntesis de clorofila; supuso entonces que las células eran impermeables al δ-ALA agregado, análogamente a lo postulado por Boutin y Klein (1972) en células de Euglena.

Sin embargo, Hoverkamp-Obberna (1975) demostró que el ALA penetra perfectamente en las células de Euglena no solo empleando ALA marcado radioactivamente sino también por el hecho de que células en las cuales sus reservas se habían agotado, el agregado de δ-ALA estimula la síntesis de clorofila. Por otro lado, es sorprendente que aún en estas condiciones, el lag no desaparece; esto podría significar que inicialmente en Euglena, algún otro compuesto y no el δ-ALA estaría limitando o regulando la síntesis de clorofila. Más tarde, este factor sería aparentemente sintetizado en cantidades suficientes o bien ya no sería necesario para la diferenciación de los proplástidos de E. gracilis.

En 1972, Perl, postuló en base a sus experiencias un posible sistema regulatorio para la síntesis de clorofila en E. gracilis.

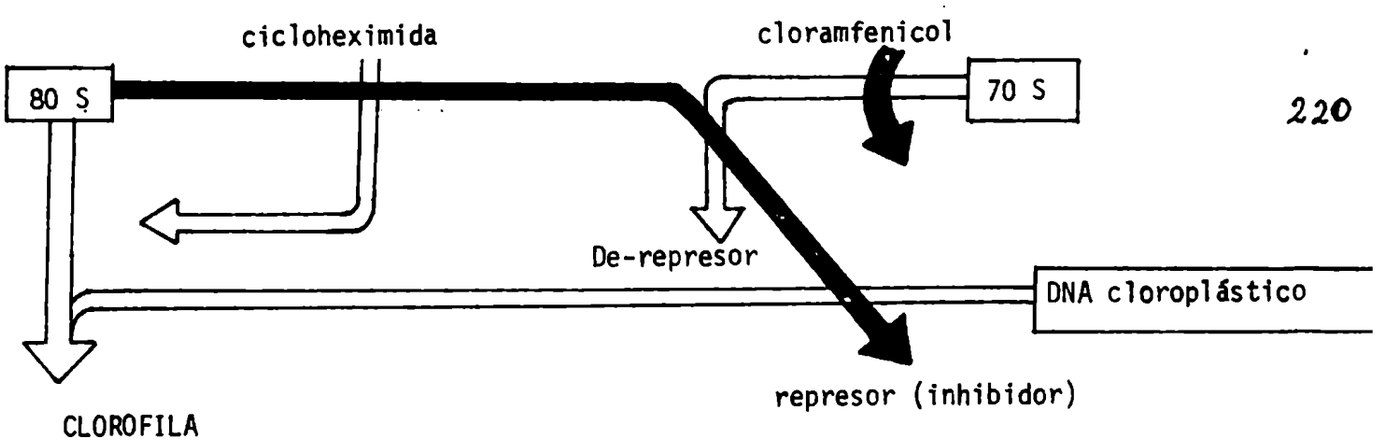
Sabemos que la formación de los cloroplastos en E. gracilis requiere la presencia continua de luz, en la oscuridad cesa la síntesis de las proteínas estructurales y de las enzimas fotosintéticas solubles asociadas con los cloroplastos. Perl encontró que cuando se iluminaban células etioladas de Euglena, la cicloheximida en concentraciones del orden de 0,1-100 µM estimulaban la síntesis de clorofila. El efecto inhibitorio de la cicloheximida sobre la incorporación de ^{14}C-Leucina en la fracción soluble en TCA y el hecho de que no afecte la incorporación de (^{32}P) ortofosfato en este material en períodos cortos de incubación; indican que este antibiótico inhibe específicamente la síntesis proteica de los ribosomas 80 S. Este hecho, junto con la estimulación que la cicloheximida ejerce sobre la formación de clorofila, se pueden explicar por la existencia de un represor que se sintetizaría sobre la fracción ribosomal 80 S e inhibiría la biosíntesis de clorofila.

El cloramfenicol (1-4 mM) inhibía la síntesis de clorofila; el efecto de este indica que la síntesis de clorofila también depende de la fracción ribosomal 70 S.

El hecho de que la cantidad de clorofila por ml de cultivo celular (puesto que el aumento no es sólo por célula) aumentara a concentraciones estimulatorias de cicloheximida, excluye la posibilidad que el efecto estimulatorio pueda resultar de una mayor inhibición por la cicloheximida sobre la división celular que sobre la síntesis de clorofila.

Los resultados obtenidos sobre la síntesis de clorofila en presencia de ambos antibióticos, cicloheximida y cloramfenicol, indican que la disminución producida por este último puede revertirse por cicloheximida, posiblemente por inhibición de la síntesis del represor.

Schwartz et al (1965) habían demostrado que los ribosomas cloroplásticos no poseían especificidad para la codificación, pero que podían cumplir un rol en el proceso regulatorio específico de la síntesis de proteínas cloroplásticas. A la luz de estos hallazgos, Perl interpretó sus resultados y los esquematizó en la diagrama siguiente:



Las flechas muestran la influencia de materiales o productos, internos o externos, sobre la síntesis de clorofila. Las líneas vacías indican la actividad represora. Las enzimas que sintetizan clorofila se forman sobre los ribosomas 80 S; que también producen una sustancia que reprime la síntesis del pigmento. Una proteína sintetizada por los ribosomas 70 S de-reprime el factor inhibitorio.

En presencia de ambos antibióticos el enverdecimiento no se inhibe; la cicloheximida detiene la síntesis del represor y por lo tanto no se necesita la de-represión para que se sintetice clorofila; por lo tanto el cloramfenicol no tiene efecto sobre el enverdecimiento si está presente la cicloheximida. El efecto de la luz sobre la actividad de los ribosomas cloroplásticos parecería ejercerse a través de la síntesis del de-represor en la luz, por esta fracción ribosomal.

Además la síntesis del represor durante el período de crecimiento en la oscuridad procede más rápidamente que la síntesis del de-represor por los ribosomas 70 S; esto indicaría que su síntesis sería intensificada en presencia de luz.

Por lo tanto, el autor sugiere que la formación de clorofila estaría sujeta al control de un represor citoplasmático sintetizado sobre los ribosomas 80 S y a un de-represor producido sobre los ribosomas 70 S.

ESTUDIOS SOBRE LA CICLOTETRAMERIZACION ENZIMATICA DEL PORFOBILINOGENO
Su Mecanismo

POR

MARIA VICTORIA ROSSETTI

Tesis Presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

de la UNIVERSIDAD de BUENOS AIRES

Director: Dra. Alcira N. del C. Batlle de Albertoni

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
Universidad de Buenos Aires

BUENOS AIRES, Diciembre de 1978

TOMO II

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Porfobilinógeno: El PBG ó ^{14}(C)-PBG se obtuvo enzimáticamente según la metodología descripta por Sancovich, Batlle, Ferramola y Grinstein (1970), a partir de ALA-D de hígado bovino y ALA ó ^{14}(C)-ALA (Sigma Chemical Co, USA) respectivamente.

Sulfato de Amonio: (Merck, grado analítico) se utilizó como droga sólida. Para calcular los gr. de sal que es necesario agregar para pasar de cualquier porcentaje de saturación a otro, se usó el nomograma correspondiente (Dixon, 1953).

Geles de Sephadex o Sepharosa: se emplearon los geles de Pharmacia, Upsala, Suecia, Las dimensiones de las columnas empleadas son las que se detallan a continuación:

Sepharosa 4B: Volumen de cama: 195 ml; V_o: 68 ml; Flujo: 38 ml /h; ϕ_i : 2, 6 cm; largo columna: 40 cm.

Sephadex G-100: Volumen de cama: 195 ml; Flujo: 40 ml/h; ϕ_i : 2, 4 cm; largo columna: 59, 5 cm.

Sephadex G-25 mediano: Volumen de cama: 105 ml; Flujo 45-50 ml/h; ϕ_i : 1, 4 cm; largo de columna: 110 ml.

Sephadex G-25 grueso: Volumen de cama 120 ml; ϕ_i : 1, 8cm; largo de columna: 1, 8 cm.

Gel de fosfato de Calcio: Se preparó según el métido de Keilin y Hartree (1951).

Acido Tricloroacético: Se empleó BDH A. R. y la concentración se expresa como peso de ácido por 100 ml. de solución.

Buffers: A lo largo de todo el trabajo fue empleado, salvo indicación contraria, buffer fosfato de sodio 0, 05 M pH: 7, 4.

Todos los demás reactivos y solventes usados fueron de grado P. A., provenientes de distintas fuentes comerciales.
Para la preparación de todas las soluciones empleadas se usó agua desionizada y bidestilada.

METODOS

Fuente de enzima: Euglena gracilis Klebs strain, Z Pringsheim.

Cultivo y crecimiento del tejido: Las primeras células de Euglena gra-

cilis fueron provistas gentilmente al Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias, por los Dres. Belocopitow y Marechal del Instituto de Investigaciones Bioquímicas "Fundación Campomar".

Para su crecimiento se empleó el medio de Hutner modificado (Price y Valle, 1962; Price y Carell, 1964) rico en proteínas, hidratos de carbono, vitaminas y minerales. La composición del mismo, por cada 100 ml. del mismo es la siguiente: peptona (0, 5 gm), extracto de levadura (0, 2 gm), etanol (1 ml) y vitamina B_{12} (5 ug) y H_2O hasta completar el volúmen. El medio de cultivo y todo el material empleado en los repiques se esterilizan con vapor a 1, 5 atm durante 20-30' en una autoclave apropiada.

Para el mantenimiento de la cepa se emplean células crecidas a la luz, sembradas en tubos de agar (2%) inclinado, que luego, una vez cubierto el mismo con el tejido, se guardan a 4°C hasta el momento de ser utilizados.

Para su uso se repican inóculos del medio sólido a tubos con medio líquido (10-15 ml) los cuales se hacen crecer a la luz u oscuridad según se indique.

Después de 5-6 días, en el caso de células crecidas a la luz, ó de 6-12 días para células crecidas en oscuridad, estos inóculos se repican a frascos Roux de 1 litro de capacidad, conteniendo cada uno 2000 ml. de medio de Hutner.

Luego de un determinado número de días de crecimiento a 28 °C, ya sea a la luz ú oscuridad, según se especifique más adelante, se cosecharon las células por centrifugación a 12.000 x g durante 10' en centrífuga refrigerada International B 20. Posteriormente se las lavaron con buffer fosfato 0, 05 M pH 7, 4. Todas las operaciones desde la etapa de cosecha en adelante se llevaron a cabo a 4 °C.

Aquellos estudios en los cuales se emplearon extractos frescos de Euglena gracilis se realizaron con las células inmediatamente después de cosechadas.

Los cultivos crecidos a la luz recibieron una intensidad luminosa de 900 ftc a una distancia de 10-15 cm.

Para la mayoría de los estudios, salvo indicación contraria, se emplearon células de E. gracilis crecidas a la oscuridad, durante 4 días en semianaerobiosis.

1.2.1.2. Extracción de la proteína enzimática: En el día de crecimiento indicado (cuarto día) se cosecharon las células por centrifugación, durante 10' a 10.000 rpm; una vez descartado el medio se procedió a la extracción de la proteína enzimática según la metodología standard, descripta a continuación, salvo indicación contraria. El precipitado tejido fresco (T. F.) se suspendió en buffer fosfatos de sodio, pH 7,4 0,05 M; en la relación 1:2 (gm TF/ml). Esta suspensión se sonicó durante 30 segundos, de a volúmenes de 5-6 ml. cada vez obteniéndose así la fracción enzimática denominada Homogenato (H). Este se centrifugó a 14.000 rpm (24.000 x g) por 30 minutos, separándose así un sobrenadante (S) y un pellet (P), el cual se suspendió en un volúmen de buffer igual al de sobrenadante. Todas las operaciones se efectuaron frío.

1.2.1.3. Preparación de polvo acetónico de E. gracilis Z: Se siguió la metodología de Tigier y col (1970) con ligeras adaptaciones de acuerdo con el tejido empleado, según se describe a continuación.

A 10 volúmenes de acetona redestilada, previamente enfriada a -20°C, se añade rápidamente con agitación, un volúmen de homogentato (1-2 gr de células recién cosechadas, que designaremos arbitrariamente "tejido fresco": TF, en 1 ml de buffer) y se lo deja sedimentar 10 -15 minutos en un baño de acetona-hielo seco. Luego se lo retira del baño y se lo deja reposar aproximadamente 10-20 minutos a temperatura ambiente. El precipitado se filtra al vacío y se lo lava con acetona redestilada helada hasta que el líquido de los lavados tenga una pálida tonalidad verdosa para el caso de células crecidas a la luz y totalmente incolora para aquellas crecidas a la oscuridad.

Para secar el precipitado se tapa el embudo Büchner con una pieza de látex que ajuste perfectamente para evitar la entrada de aire. Se obtienen así polvos con un leve color verdoso o amarillo muy pálido según las condiciones de crecimiento del tejido de partida. Estos polvos se conservan y pueden almacenarse varios meses en desecador al vacío en presencia de cloruro de calcio.

1.2.2. Determinación de la actividad enzimática.

1.2.2.1. Sistema standard de incubación: A menos que se indique lo contrario, los sistemas standard de incubación contenían: la preparación enzimática (en general 2 ml), 20 ugr PBG/ml y buffer fosfatos de sodio 0,05 M pH 7,4, en un volúmen final de 3 ml.

Las incubaciones se hicieron anaeróbicamente, en tubos de Thumberg, en oscuridad y con agitación mecánica, a 38° C durante 4 horas. El pH fué controlado antes y después de la incubación con un pH-metro Knick de un electrodo y el valor promedio se mantuvo siempre en la zona del pH óptimo.

Se hicieron blancos de actividad enzimática los cuales contenían PBG y la enzima se agregaba al final de la incubación o bien la enzima, en cuyo caso el PBG era agregado al final de la misma.

Por lo tanto, en todos los casos los datos de actividad enzimática fueron corregidos por las porfirinas formadas no enzimáticamente.

Al terminar la incubación se agregó TCA para precipitar la proteína (concentración final : 5 ó 10%) y la mezcla se expuso a 50 ftc de luz blanca para oxidar los porfirinógenos a porfirinas. La proteína inactiva se filtró a través de papel plegado lavándose el precipitado 5 veces con 1 ml de TCA 5% cada vez. Los filtrados se reunieron determinándose en los mismos las porfirinas totales formadas y la cantidad de PBG remanente según la metodología descripta más adelante.

Cuando se estudió el efecto de los intermediarios biosintéticos se introdujeron modificaciones en el sistema de incubación, las cuales se detallarán oportunamente. En este caso, se hicieron blancos adicionales con enzima más intermediario o intermediario más PBG sin enzima. Los sistemas se completaron al final de la incubación. También en estos casos, como siempre, se hicieron las correcciones correspondientes por la cantidad de PBG presente en las soluciones que contenían los intermediarios. Una vez precipitada la proteína con TCA, se retiró una alícuota (aproximadamente 0, 5ml), la cual se neutralizó inmediatamente con NaOH 5M para realizar cromatografía en placa de los pirroles presentes. El resto de la solución se la sometió al mismo tratamiento ya descripto anteriormente, para la determinación de porfirinas totales formadas y PBG remanente en los filtrados correspondientes.

1.2.2.2. Estimación espectrofotométrica de las porfirinas en medio ácido: La cantidad total de porfirinas formadas por los incubados se determinó espectrofotométricamente en la solución ácida (Rimington, 196) empleando la fórmula corregida de Rimington y Sveinsson (1950). La densidad óptica se leyó a 380 mu, 430 mu y en el máximo de Soret (E máx), calculándose la cantidad de porfirinas formadas según la si

guiente fórmula:

mumoles porfirinas = 2 E máx - (E 380 + E 430) x F x V

donde V es el volúmen de la solución y E son las absorbancias leídas a las longitudes de onda indicadas por los índices 380 y 430. El factor f tiene el valor de 1, 008 para Uroporfirina; 1, 287 para Coproporfirina y 2, 17 para la Protoporfirina, todos en ClH o TCA 5% y 1, 121 para Coproporfirina en HCl 0, 36%.

1.2.2.3. Estimación del PBG: La determinación del PBG se basa en su reacción con el p-dimetilaminobenzaldehido (PDMAB), en medio ácido (reactivo de Erhlich), para dar un compuesto rojizo. Todas las modificaciones de este reactivo tienen en común el gran exceso de PDMAB, difiriendo en la concentración y presencia de distintos ácidos.

En 1964, Moore y Labbe, describieron un método para la estimación del PBG, cuya ventaja radica en el hecho de que el reactivo empleado es muy estable durante largo tiempo si se lo conserva en frío y oscuridad. Este está compuesto por PDMAB (2 gr), HCl (c) (25 ml) y AcOH (gl) (75 ml). La técnica empleada para la determinación del PBG consiste en mezclar un volúmen de muestra o de una dilución apropiada de la misma, según el caso con un volúmen igual del reactivo, a temperatura ambiente. Se desarrolla un color rojizo cuya intensidad máxima se alcanza a los 8 minutos, manteniéndose constante hasta los 15 minutos, cuando recién comienza a decaer, lo cual se debe a la reacción del aldehído con una segunda molécula de pirrol. Se ha establecido que la relación entre las concentraciones de aldehído y del ácido fuerte influyen en la velocidad de la reacción, mientras que la concentración del ácido acético influye en el desarrollo de la intensidad del color (Cookson y Rimington, 1954).

1.2.2.4. Unidad enzimática: Se la ha expresado como función del producto formado y del sustrato consumido, o sea, nmoles porfirinas/4 horas y microgramos PBG consumido/4 horas.

La actividad específica será, por lo tanto nmoles porfirinas formadas/mg proteínas. 4 horas y microgramos PBG consumido/mg proteína. 4 horas.

En todos los casos, para los cálculos se restaron siempre los valores de porfirinas formadas y PBG consumido de los blancos correspondientes.

1.2.2.5. Fraccionamiento y determinación de las porfirinas formadas en las incubaciones: Se siguió la metodología descripta por Batlle y Grinstein (1964a) la cual consiste en evaporar la solución ácida correspondiente desproteinizada, a sequedad en vacío y disolver el residuo en la mezcla de esterificación $SO_4 H_2$: CH_3OH (5% v/v) dejándolo en oscuridad a temperatura ambiente durante 24/36 horas.

La identifación y estimación cuantitativa de las porfirinas esterificadas se realizó según la técnica de Batlle y Grinstein (1962c). La solución de las porfirinas esterificadas se pasó a cloroformo y se lavó con exceso de agua hasta acidez negativa y una vez con ClNa 7% para destruir cualquier emulsión que se pudiera haber formado. Se filtró por papel embebido con cloroformo y la cantidad total de porfirinas presentes en el filtrado se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\mu gr \text{ porfirinas} = 2\ E\ máx - (E\ 380 + E\ 430) \times 2,721 \times V\ total$$

1.2.2.6. Determinación del tipo isomérico: La composición isomérica de las fracciones de Uroporfirinas, como así también la presencia de porfirinas de distinto número de carboxilos, se determinó por los métodos semicuantitativos de Conford y Benson (1963) y Batlle y Benson (1966) los cuales se basan en el método cualitativo original de Falk y Benson (1953).

La solución clorofórmica en la cual se midieron las porfirinas totales esterificadas, se llevó a sequedad en baño de agua a 100°C; el residuo se disolvió en un pequeño volúmen de cloroformo y se sembró sobre una tira de papel Whatman 1 (23 x 9 cm), a 2 cm del borde inferior.

La siembra se hizo en forma de banda (1 µgr porfirina/cm) o en punto según la cantidad de porfirinas presentes en las muestras. Se sembraron además testigos de ésteres metílicos de Uro I y III, Firia III y Copro III.

Se empleó una cormatografía de tipo ascendente a temperatura ambiente que requiere dos desarrollos en el mismo sentido, en dos cubas independientes. El solvente para saturar las cubas se coloca por lomenos una hora antes, para la empleada en la primera corrida y 24 horas antes para la otra. En la primera corrida se emplea como solvente de corrida kerosene: Cl_3 CH/MeOH (98:2 v/v) en relación (6:9 v/v) en atmósfera de cloroformo. Se dejó correr hasta que las manchas, cuya posición se determinó por observación de la fluorescencia roja característica bajo luz U.V., se hubieran mo

vido alrededor de 1/3 del total del camino disponible, lo que ocurrió en aproximadamente 20-30 minutos. Al cabo de este tiempo, se retiró el papel de la cuba y se secó en corriente de aire tibio.

Los ésteres de las Uroporfirinas I y III y Firia III se movieron casi a la misma velocidad, mientras que los de Copro I y III corrieron un poco más: En la línea de siembra quedaron trazas de porfirinas libres y otras impurezas no móviles. Se cortó el papel 0, 5 cm por debajo de las manchas, con el fin de eliminar las impurezas; la posición de las machas se marcó con una línea punteada.

La segunda corrida se hizo en la misma dirección que la primera empleándose como solvente de corrida kerosene: dioxano en la relación 4:2 (v/v), en atmósfera de dioxano, durante 2-2 horas y media. Cuando el frente del solvente alcanzó la parte superior del papel, este se retiró de la cuba y se secó en corriente de aire tibio. Se marcó la posición de la macha, determinada por su fluorescencia bajo luz U. V., con línea llena identificándose cada una por comparación con los testigos. Con este método se logra una buena separación de las distintas porfirinas, así como de los isómeros I y III de la Uroporfirina pero no de los tipos isoméricos de las otras porfirinas.

En algunas experiencias se empleó el método de With (1975). La cromatografía se realizó en placas de vidrio de 10 x 20 cm cubiertos con una capa de 0, 25 cm de espesor de sílica gel en agua (40 gr:80 ml de agua). Las placas se secaron una hora a 100-105°C y se mantuvieron en un recipiente cerrado sobre Cl_2Ca y SO_4H_2; antes de usarlas se reactivaron 10 minutos a 105°C.

Se sembraron las muestras disueltas en cloroformo en punto, con 2 a 3 cm de distancia entre cada una; también se sembraron los testigos correspondientes (Uro, Firia y Copro) en ambos lados de la placa. Este método también se basa en dos corridas ascendentes. En la primera se emplea como solvente de corrida benceno: metil etil cetona en la relación 40:3 (v/v) en el cual se coloca aproximadamente 10-15 minutos antes. Se deja desarrollar el cromatograma durante 60 minutos con el fin de mover las impurezas que puedan interferir, hasta la parte superior de la placa. Esta se retiró de la cuba y se secó en corriente de aire seco.

Para la segunda corrida se empleó como solvente de desarrollo benceno:acetato de etilo:metanol en la relación 20:0, 5:2 (v/v/v), el cual se colocó también 10-15 minutos antes de introducir la placa. Se dejó correr durante 80-90 minutos, luego se retiró la placa y se secó en corriente de aire tibio, determinándose la posición de las manchas por su fluorescencia bajo luz U. V. e identificándoselas

por comparación con los testigos correspondientes como ya se indicó. Con este método no se obtiene preparación de los isómeros de ninguna de las porfirinas pero sí una muy buena separación de cada una de ellas.

Para determinar cuantitativamente la composición de porfirinas se cortó cada mancha (en el caso de la cromatografía en papel) o se raspó de la placa con espátula y se introdujo en un tubo de ensayo pequeño. Se eluyó tres veces con un 1 ml de cloroformo cada vez y se determinó espectrofotométricamente la concentración de porfirinas correspondientes a cada banda en el eluído resultante.

1.2.3. Determinación del contenido proteico.

La concentración proteica se determinó empleando según las circunstancias, dos métodos: el de Lowry (Lowry et al, 1951) y el de Warburg y Christian (Warburg y Christian, 1941).

1.2.3.1. Método de Lowry: A 0,4 ml de una dilución apropiada de la solución proteica, se le agregan 2 ml de una solución de CO_3Na_2 2% en NaOH 0,1N:$SO_4Cu.5H_2O$ 0,5% en tartrato de Na y K1% (20:0,4 v/v). Se mezcla y se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregan 0,2 ml. del reactivo de Folín -Ciocalteau diluído al medio con agua, se agita inmediatamente y luego de 30minutos se desarrolla completamente el color azulado característico del complejo formado, el cual es estable con el tiempo. Se lee la densidad óptica a 660 mμ y se calcula la concentración proteica según la siguiente fórmula:

mgr proteina/ml solución = A660 x 0,23 x dilución/0,4

donde A660 es la absorbancia leída a 660 nm y la dilución las veces que se diluyó la solución original.

1.2.3.2. Método de Lowry modificado: En las experiencias preliminares realizadas para el estudio de la PBGasa en Euglena gracilis se encontraron dificultades para la correcta cuantificación del contenido proteico, especialmente cuando se trabaja con extractos crudos. Esto llevó a introducir necesariamente algunas modificaciones a la técnica original descripta por Lowry y colaboradores (1951). Se procedió a secar en un tubo apropiado 0,1 ml del extracto proteico, ya sea en

una estufa a 80°C o bien al vacío en un recipiente (8 x 20 cm) en una atmósfera deshidratante compuesta por 30 ml de SO_4H_2 (c) comercial y un tubo de pirex con granallas de NaOH. En este último caso, para acelerar el proceso de secado, se sumerge el recipiente en un baño de agua a 80°C. Para neutralizar los vapores ácidos, se coloca un intermediario con granallas de hidróxido de sodio. La proteina seca, en el fondo del tubo se suspende en hidróxido de sodio 0,6 M, lo cual se logra calentando la mezcla en un baño de agua a 30-40°C o dejándola a temperatura ambiente durante 30 minutos. El primer tratamiento debe aplicarse solo en aquellos casos en los cuales el residuo proteico sea altamente insoluble en la base puesto que el sistema así tratado puede enturbiarse haciéndose imposible la cuantificación de las proteínas presentes Luego 0,4 ml de la solución proteica básica o 0,4 ml de una dilución apropiada de la misma se mezclan con 2 ml de una solución de composición similar a la descripta anteriormente pero sin hidróxido de sodio. De allí en adelante, la metodología es idéntica a la del método de Lowry ya detallado.

1.2.3.3. Método de Warburg y Christian: Se basa en las lecturas de densidad óptica realizadas a 280 nm, la cual dá una medida del contenido proteico y a 260 nm que da cuenta de la presencia de ácidos nucleicos. Calculando el cociente $R = A_{280nm}/A_{260nm}$ y por medio de los datos tabulados en "Methods in Enzymology" se obtiene el valor F, el cual multiplicado por la A_{280nm} nos da la concentración proteica en mg/ml

$$\text{mg proteina/ml solución} = F \times A_{280nm}$$

este método dá resultados comparables al de Lowry cuando el contenido de ácidos nucleicos es muy bajo. En muchas experiencias se determinó la cantidad de proteinas presentes por ambos métodos observándose que los valores en algunos casos, no eran coincidentes, debido seguramente al elevado contenido de ácidos nucléicos en este tejido.

Por este motivo salvo indicación contraria, los datos tabulados se basan en las determinaciones realizadas por el método de Lowry, empleándose el de Warburg y Christian sólo como aproximativo generalmente en los casos de cromatografías en columnas para conocer rápidamente los perfiles de elución proteica.

1.2.4. Medición de clorofila en extractos de E. gracilis

La extracción de clorofila de los distintos extractos de Euglena se realizó con acetona: agua (80:20 v/v), siguiendo la técnica clásica de Arnon (1949). De acuerdo con la fracción en estudio se varió la relación entre el volúmen de la muestra y el solvente de extracción. Así, para células recién cosechadas o tejido fresco en suspensión homogenato y pellet de células crecidas a la luz, las re

laciones empleadas fueron 1:50 (v/v) para el primer caso y 1:10 para los dos últimos casos. Para el sobrenadante de 24.000 x g, también de células crecidas en presencia de luz, se usó la relación 1:5 (v/v).

Para realizar estas extracciones se emplearon tubos con tapón esmerilado; luego de una enérgica agitación y filtración con papel de filtro, se midió en el sobrenadante la densidad óptica a 645, 652 y 663 nm. El contenido de clorofila se calculó según las siguientes relaciones:

mg clorofila totales/ml solución =
A_{652nm} * dilución x 1000/34,5

mg clorofila totales/ml solución = dilución/1000x(20,2 A_{645nm}+8,02 A_{66}

los resultados obtenidos por ambas fórmulas fueron coincidentes.

1.2.5. Cromatografía por tamices moleculares: En el transcurso del trabajo se emplearon distintos geles de dextrano o agarosa. El tratamiento previo que se debió realizar para su uso como así también el armado de columnas, es el descripto por Batlle (1965, 1967 y 1968) el cual se puede resumir en los siguientes pasos:

1) En los casos en que el gel debía hincharse previamente a su uso (Sephadex G-25, Sephadex G-100) se procedió de la siguiente forma: una determinada cantidad de polvo seco de gel (la cual dependía del grado de hidratación del mismo y del volúmen del gel húmedo que se quería obtener) se añadía a un gran volúmen de agua, se mezclaba y se dejaba en reposo. La hidratación se logra luego de un tiempo variable, de acuerdo con el gel en uso. Luego de este lapso la suspensión se agita, se permiten sedimentar las partículas del gel y se decanta varias veces el sobrenadante para eliminar las partículas finas, hasta obtener un sobrenadante límpido. Para evitar la formación de burbujas tanto el agua como el buffer y el gel se desairean aplicando vacío.

2) Para el empaquetamiento del gel se emplearon columnas de vidrio cilíndricas, cuyas dimensiones fueron variables y se indicarán en cada caso, con el extremo inferior extrangulado de tal forma que el tubo de salida tenga 2-2,2 mm de diámetro. Este se conecta a un tubo flexible (de látex o teflón) provisto de una llave de Mohr, lo suficientemente largo como para poder variar la presión hidrostática y lograr el flujo deseado. En el fondo de las columnas se coloca un clavo de vidrio y sobre éste una doble capa de pañal-sec del diámetro de la columna depositándose sobre ella una capa de bolitas de vidrio (1-1,5mm de diámetro) para lograr una superficie plana lo más homogénea posible y una cámara de mezcla pequeña.

El extremo superior de la columna se conecta a un llenador diseñado por nosotros, (tubo cilíndrico) por medio de una conexión esmerilada. La columna con la salida cerrada, se llena hasta las 3/4 partes de su longitud con buffer o agua desaireados y el gel, también desaireado, se agrega rápida pero cuidadosamente a través del llenador; de esta forma el gel sedimenta lentamente. Cuando se formó una capa de gel de aproximadamente 20 cm y casi todo el gel penetró en la columna, se abre la llave de Mohr y con una diferencia de 10-20 cm de presión hidrostática se permite el empaquetamiento del gel en la columna, el cual se dá por finalizado cuando la altura del gel permanece invariable. Luego se equilibra la columna con el buffer a emplear pasando por lo menos 2 camas del mismo antes de la corrida. Este procedimiento se repite invariablemente cada vez que se ha usado la columna, de modo que ésta quede siempre en condiciones de ser usada nuevamente. La aplicación de la muestra puede realizarse de dos formas distintas: eliminando el exceso de líquido sobre la superficie del gel y sembrando la solución directamente sobre la misma o sin eliminar el líquido superior se aumenta la densidad de la muestra por agregado de una punta de espátula de ficoll o sacarosa y se siembra dejando caer la muestra sobre la superficie del gel, a través del líquido por medio de una pipeta capilar. Se conecta entonces la columna a una ampolla con buffer y se procede a corrida, elución y recolección de las distintas fracciones. En cada fracción se determina el contenido proteico y la actividad enzimática.

1.2.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

La metodología empleada es la descripta por Ornstein (1964) y Davies (1964). Los geles se prepararon a partir de 3 soluciones stocks cuya composición es la que se detalla a continuación: a) 0,23 ml de TEMED (N, N', N'', N''' tetrametilen diamina) disuelto en 100 ml de buffer Tris-ClH 0,48 M pH 8,9. b) 28 gr de acrilamida, 0,735 gr de bisacrilamida (N, N' metilen bisacrilamida) disueltos en 100 ml de agua. c) 140 mg de persulfato de amonio disuelto en 100 ml de agua.

Se mezclan un volúmen de la solución a), dos volúmenes de b), 4 volúmenes de c) y un volúmen de agua. La mezcla se desairea y se colocan en un tubo (0,4 x 15 cm) con un extremo tapado.

Para eliminar el menisco se colocan sobre la mezcla gelificante unas gotas de agua. La gelificación ocurre en 20-30 minutos a temperatura ambiente. Las soluciones stocks a) y b), así como los geles pueden conservarse en la heladera durante varios días sin que cambien sus propiedades, no así la solución c) que debe prepararse en el momento de su uso. Los geles ubicados dentro de los tubos, con sus extremos libres, se colocan en una cuba de electroforesis. Se siembran entre 50-100 γ de cada muestra en presencia de sacarosa al 10% y 0,05 ml de solución de azul de bromofenol (0,1% de colorante en AcOH al 7%).

La electroforesis se desarrolla empleando como buffer Tris-glicina 0,005 M pH 8,3, conectando las cubas a una fuente de poder y aplicando a cada tubo de 1 a 5 mA. El tiempo de corrida oscila entre 4 y 6 horas, luego del cual el gel se colorea con solución de amido Schwartz 10B al 1%, disuelto en acético al 7%, dejando en contacto el gel con el colorante durante 30 minutos. Los geles se decoloran luego con ácido acético al 7%.

En los casos en que el contenido proteico de la muestra a sembrar era muy bajo se empleó como solución colorante Comasie-Blue (1,25 gr en 454 ml de MetOH al 50% y 46 ml de ácido acético glacialP, dejándolo en contacto durante toda una noche. Luego se lavan con agua y se decoloran con varios lavados de una solución de AcOH: CH_3OH:H_2O (75:50:875; v/v/v).

1.2.7. Estimación de pesos moleculares.

1.2.7.1. Empleando tamices moleculares: Se realizó de acuerdo con el método de Andrews (1964, 1965) y Batlle (1967) quienes comprobaron que la filtración por geles es un método simple y rápido para la determinación del peso molecular de distintas proteínas.

En el caso de proteínas globulares las determinaciones están afectadas de un error aproximado del 10%. Las causas de error más comunes son: diferencias de formas entre proteínas, la correcta determinación del volúmen de elución y las diferencias de densidad de las soluciones proteicas.

La calibración de las columnas se realizó con proteínas de peso molecular conocido, graficándose el Ve (volúmen de elución) de los mismos o log Ve en función del log P. M.; se obtienen curvas de calibración como las que se representan en las Figuras 61a y 61b. Así se pasa por ella una proteina y se calcula su Ve, de la curva de calibración, se obtiene directamente su peso molecular, el cual va a estar afectado lógicamente, de los errores experimentales ya citados.

1.2.7.2. Empleando electroforesis en geles de poliacrilamida: Los geles se preparan en forma similar a la ya descripta en las condiciones experimentales. Para calcular la migración de la muestra se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ migración} = (d_1/l_1 \times d_2/l_2) \times 100$$

donde d_1: distancia alcanzada por la proteina al final de la corrida;

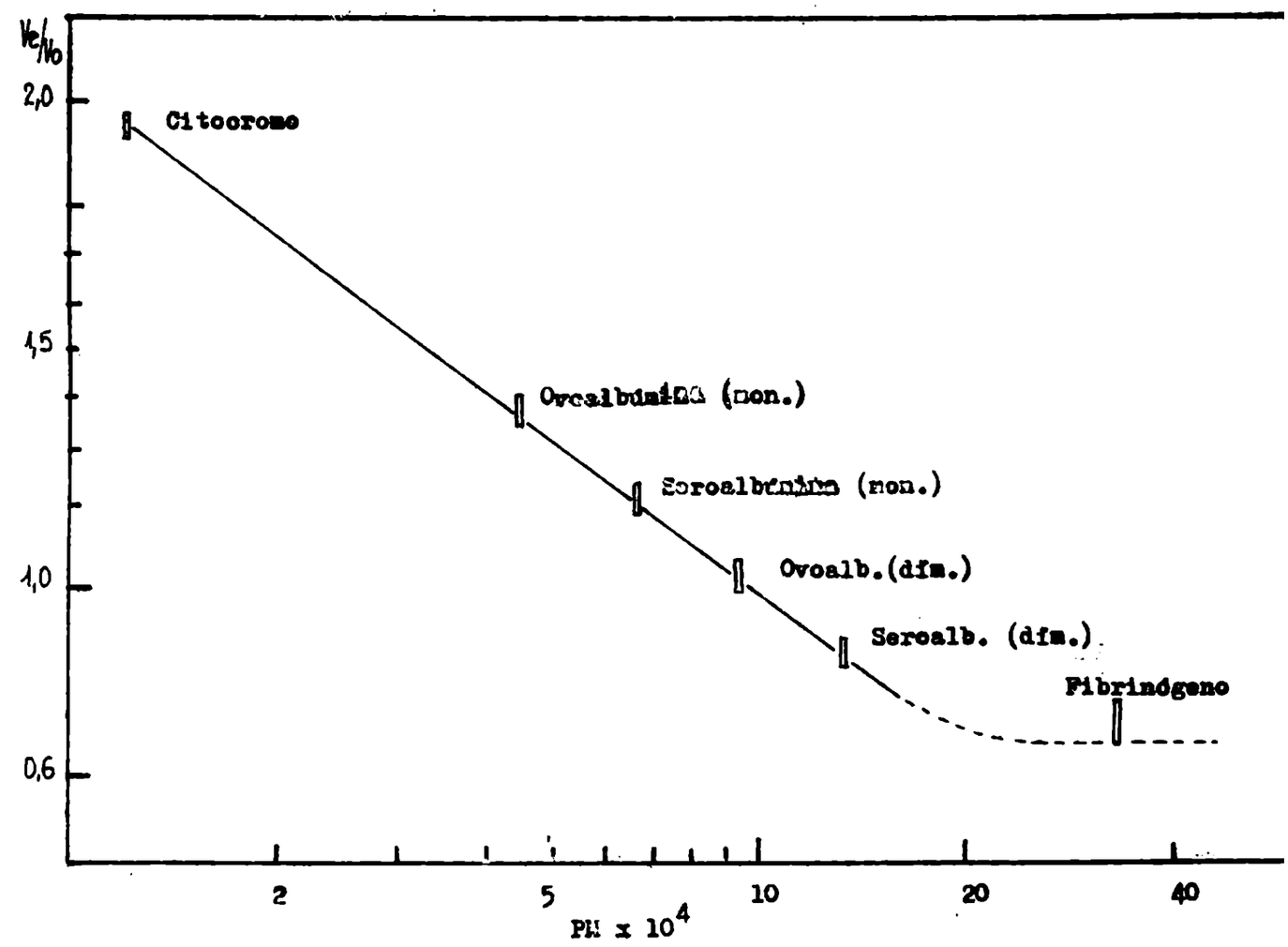


Figura 6: Curva de calibración para la determinación de Pesos Moleculares, empleando una columna de Sephadex G-100

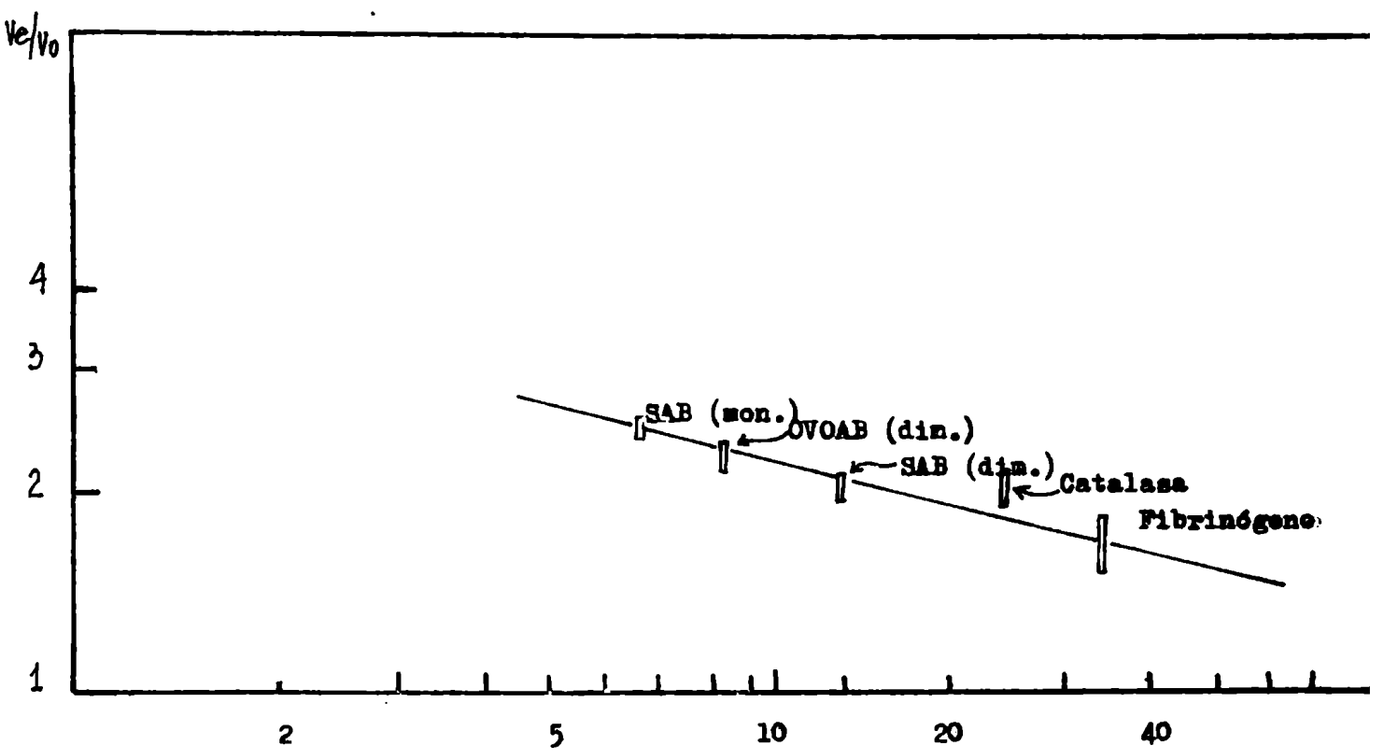


Figura [illegible]: Curva de calibración para la determinación de Pesos Moleculares, empleando una columna de Sepharosa 4B.

l_1: longitud del gel después de la decoloración;

d_2: distancia del colorante azul de bromofenol al final de la corrida;

l_2: longitud del gel antes del teñido

Se deben hacer estas correcciones debido a que el tratamiento de coloración y decoloración provee cambios en la longitud del gel.

Smith modificó ligeramente las técnicas colocando un pequeño alambre a la altura del colorante de azul de bromofenol, antes de la coloración. Esto permite simplificar la fórmula de la siguiente manera:

$$\% \text{ migración} = d_1/d'_2 \times 100$$

donde d'_2 es la distancia alcanzada por el colorante luego de la decoloración. Se hace una curva de calibración, utilizando distintas proteínas de peso molecular conocido, calculando su movilidad electroforética y graficando su porcentaje de migración en función del log del P. M.

1.2.8. Cromatografía de mono y polipirroles.

Se siguió la metodología descripta por Llambías y Batlle (1970a). Se emplearon placas de sílica gel-agua (1:2 p/v) de 20 x 20 cm y 0,25 mm de espesor, las cuales se secaron al aire durante aproximadamente 20 minutos y luego a 105°C durante una hora. Se guardaron en un desecador con cloruro de calcio y se reactivaron calentándolas a 105°C 10 minutos previo a su uso.

El desarrollo se llevó a cabo por el método ascendente, en cubas de vidrio rectangulares durante 4-5 horas a temperatura ambiente y oscuridad, empleando como solvente de corrida n-butanol: AcOH: H_2O (4:1:5 v/v/v). Se sembraron como testigos PBG biosintético, un dipirrilmetano sintético (PAPA) donado gentilmente por los Dres. Ana María y Horacio Sancovich y Uroporfirina biosintética.

Una vez finalizada la corrida las placas se secaron en corriente de aire tibio y se detectó la posición de las manchas pulverizando con el reactivo de Ehrlich. Cuando se sembró proteína

simultáneamente con los pirroles intermediarios, la posición de aquellas se reveló con ninhidrina.

1.2.9. Equipos utilizados.

Para las centrifugaciones se emplearon una centrífuga refrigerada International B20 o Spinco modelo L, una centrífuga clínica y una Heraeus-Christ.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Beckman DB o DU y en un Spectronic 20 Bausch & Lomb.

Las mediciones de radioactividad se realizaron en un contador Nuclear Chicago; las muestras se prepararon en planchetas de aluminio de espesor infinitamente delgado.

RESULTADOS Y DISCUSION

"El conocimiento no es una carpeta de notas sueltas acerca de hechos. Sobre todo, existe la responsabilidad de lo que somos y realizamos. No podemos hacer simplemente uso de conocimientos ya adquiridos. Si dentro de los próximos 50 años, el entendimiento de los orígenes del mundo, del hombre, su evolución, historia y progreso, no ocupan un espacio común en los textos, dejaremos de existir. Ese espacio común de los libros de mañana, es la aventura de hoy, y en ella estamos comprometidos nosotros".

J. Bronowski, en "The ascent of man" (1973).- Publicado por la BBC de Londres y J. Canston & Son Ltd., London & Eastleigh, England.

I.- ESTUDIOS PRELIMINARES

I.- 1.- CONSIDERACIONES GENERALES:

Como lo hemos señalado, y deseamos reiterarlo, es voluminosa la investigación llevada a cabo sobre Euglena, pero relativamente reducida la vinculada en particular con las enzimas involucradas en la biosíntesis de los tetrapirroles y más aún la referente a la conversión del monopirrol PBG en porfirinógenos, estudiada sólo indirecta y cualitativamente por Carel y Kahn (1964).

Estos hechos han constituído de por sí un fuerte estímulo y al mismo tiempo casi un desafío, motivando la iniciación de esta investigación sobre el sistema enzimático que emplea al PBG como sustrato.

Lógicamente los primeros ensayos tuvieron como objeto determinar las condiciones más convenientes para detectar, extraer, medir esta actividad enzimática en Euglena gracilis. Nos referiremos enseguida a los resultados obtenidos en estas experiencias que si bien rotulamos de "preliminares", por su extensión y complejidad, nos estaban anunciando que el camino a recorrer no sería de ninguna manera simple y al mismo tiempo explicando, quizás en parte, las causas de la falta de información específica acerca de este sistema enzimático en Euglena.

Cabe notarse también que todos los datos aquí presentados corresponden o bien a promedios de repetidos ensayos, o bien a valores obtenidos en experiencias típicas, que también fueron realizadas varias veces, aún en estos casos cada cifra proviene de duplicados o triplicados. Los resultados son entonces perfectamente reproducibles, si bien como ocurre normalmente y más aún en el caso de Euglena las actividades enzimáticas iniciales variaron según el batch de células empleadas, y la época del año. Además, salvo se indique lo contrario, a partir de la etapa de cosecha, en adelante, todas las operaciones se llevaron a cabo a menos de 6°C.

Las actividades enzimáticas se determinaron siempre en base, a la cantidad de producto(s) formado(s) y también en base a la cantidad de PBG consumido; en algunos casos reportaremos ambos valores y en otros sólo los primeros haciendo mención en el texto en cuanto a los segundos.

I.- 2.- ATMOSFERA DE INCUBACION:

Teniendo en cuenta que, como ya lo comentamos en la mayoría de los tejidos, con la única excepción de callos de soya (Llambías y Batlle, 1971a), este sistema enzimático funciona igualmente en aerobiosis como en anaerobiosis, era importante determinar cuál era en este caso, la atmósfera óptima de incubación. Por otro lado, considerando que Euglena crecida en luz posee mayor contenido de clorofila que la crecida en oscuridad, podíamos esperar que la enzima fuera más activa en células verdes, como se vió que ocurría en otros casos (Batlle et al, 1975). En base a estas consideraciones se comenzó a trabajar en Euglena gracilis crecida en la luz, durante 6 días, midiéndose actividad en las fracciones designadas Homogenato (H), Sobrenadante (S) y Pellet (P), obtenidas de acuerdo con las técnicas descriptas en Métodos; en incubaciones aeróbicas y anaeróbicas.

En la Figura 62 se ilustran los datos obtenidos para esta experiencia, que fueron no sólo interesantes sino de gran importancia para la prosecución de nuestros trabajos. Observamos significativas diferencias cuando la actividad se expresa en función de las porfirinas formadas, según la atmósfera sea anaeróbica o aeróbica. Para H sólo se detecta actividad en ausencia de aire y ésta es también mayor en anaerobiosis para la fracción S; en tanto que el P es igualmente activo en ambos casos. En cambio cuando medimos consumos de sustrato, no se aprecian cambios. Este comportamiento resultó en buena parte similar al exhibido por las enzimas de callos de soya, que hasta ese momento eran como señalamos, las únicas necesariamente anaeróbicas. Esto nos estaba indicando además que el consumo de PBG no se afectaba por la presencia de oxígeno en cambio sí disminuía la formación de porfirinas; esto nos llevó a pensar que habíamos encontrado otra posible fuente productora de intermediarios polipirrólicos. De esta misma figura surge que aparentemente la actividad estaría repartida entre la fracción soluble (S) y la particulada (P), siendo aún mayor en la última, y otro dato muy llamativo fué que tanto la actividad en S como en P, como la suma de ambas, eran notablemente superiores a la del homogenato inicial (H); sugiriendo la presencia de algún componente en H que estaría inhibiendo la enzima y que podría tener propiedades regulatorias sobre su actividad. Este otro interesante fenómeno se investigó en detalle y los datos obtenidos se presentarán y discutirán más adelante.

Evidentemente fueron varias y valiosas las conclusiones extraídas de este ensayo que condujeron luego a un estudio más profundo de cada una de ellas.

I.- 3.- EFECTO DE LA TECNICA DE HOMOGENEIZACION; SELECCION DEL BUFFER DE EXTRACCION Y DE INCUBACION:

Como se indicó las primeras experiencias se llevaron a cabo obteniendo las 3 fracciones H, S, P, por sonicación de las células cosechadas suspendidas en una relación de 1 gm en 2 ml de buffer TRIS-HCL pH 7,4 0,05M. Era necesario entonces ahora determinar cual era la mejor técnica para preparar los homo-

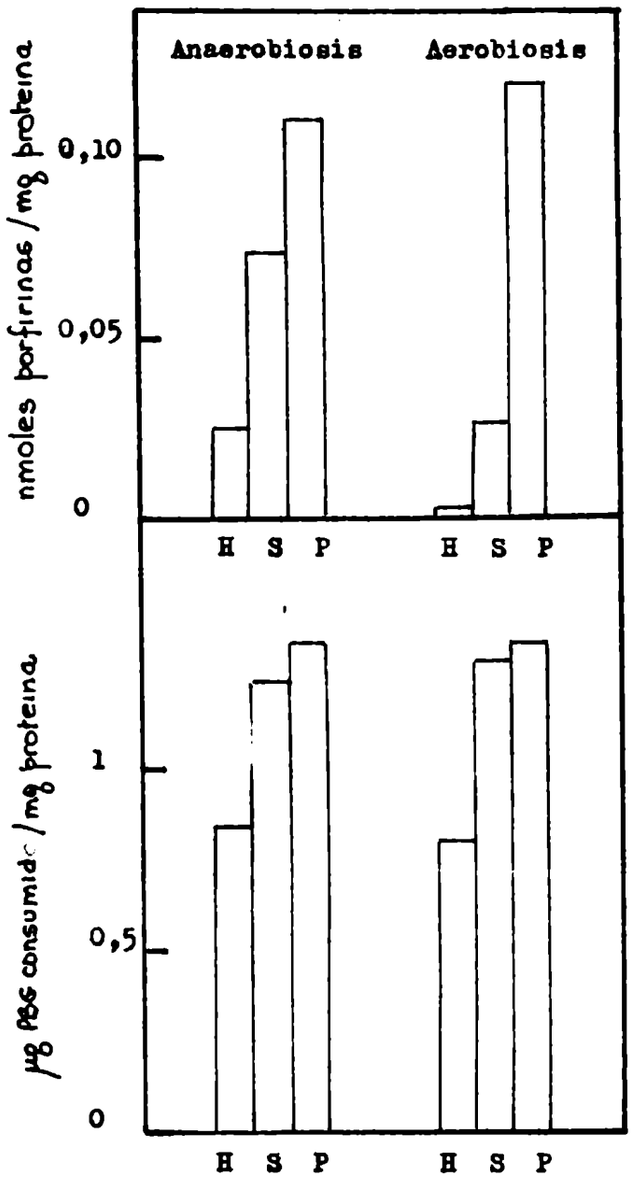


Figura 62: Variación de la actividad enzimática con la atmósfera de incubación. El sistema empleado y otras condiciones se indican en el texto o en Materiales y Métodos. El buffer de extracción empleado fue Tris-HCl 0,05M pH 7.4

genatos, comparando i) por un procedimiento mecánico, ii) por sonicación.
i) En este caso se suspendieron las células en buffer (1 gm:2 ml) y se homogeneizaron empleando un Potter-Elvehjeim (émbolo y pistón de vidrio), en porciones de 6-8 ml. El homogenato resultante se centrifugó a 25.000 x g durante 10 minutos, obteniéndose así el sobrenadante S y el pellet P.
ii) Empleando una suspensión análoga a la anterior se sonicó la misma también en fracciones de 6-8 ml por vez durante 30 segundos. El homogenato obtenido se trató como antes.

Paralelamente se investigó el efecto del buffer empleado durante la extracción y luego durante la incubación. Para lo cual se utilizaron soluciones de buffer fosfato de sodio 0,05M y de Tris 0,05M a distintos pH para la preparación del homogenato; luego o bien se incubó con el mismo buffer de extracción o se cambió por el otro, en el caso del pellet centrifugando la suspensión y resuspendiendo el mismo en el buffer indicado. En la Tabla VII se muestran los datos más representativos y solamente los obtenidos con buffers de pH 7,4 0,05M, tanto en la extracción como durante la incubación; veremos cuando nos retiramos más adelante al pH óptimo de la reacción qué a valores mayores o menores que 7,4, las actividades fueron correspondientemente menores.

En cuanto al buffer de extracción, en general se observó que con fosfato si bien se extraía la misma cantidad de proteína, la preparación era más activa que con Tris. Análogamente, el empleo de fosfato en la mezcla de incubación, también favorecía la reacción. En consecuencia se adoptó como buffer de extracción e incubación el de fosfato de sodio 0,05M pH 7,4.

Respecto a la técnica de homogenización, por sonicación parecería extraerse una cantidad de proteína activa ligeramente mayor, aunque la distribución entre el sobrenadante y el pellet es diferente a la obtenida por homogeneización mecánica; si además tenemos en cuenta la clase de profirinas formadas, se encontró que todos los homogenatos producían prácticamente 100% de Coproporfirina III, lo mismo sucedía con los sobrenadantes de sonicación, en cambio los correspondientes preparados con potter contenían alrededor de un 30% de Uro III, pequeños porcentajes de profirinas con número de carboxilos intermedios y el resto Copro III; un cuadro análogo se encontró con el pellet de igual origen (potter) en tanto que el proveniente de la sonicación en fosfatos, incubado en el mismo buffer producía prácticamente sólo Uroporfirina III, con trazas, a veces, de la fracción conocida como "Suburo" (Rimington y With, 1974). De este análisis surge claramente que con excepción del último caso, todas las otras fracciones además de PBGasa, son muy ricas en Decarboxilasas, en tanto que el pellet de sonicación no contendría Decarboxilasas o si las hubiere serían inactivas y sería una buena fuente de obtención de PBGasa. En base entonces a estas consideraciones se decidió adoptar como método de homogeneización el de ruptura por ultrasonicación.

Tabla VII Efecto de la técnica de homogeinización y del buffer de extracción e incubación

Fracción enzimática	Técnica de (+) homogeinización	Buffer (++)		Actividad enzimática	
		extracción	incubación	nmoles porfir. / mg proteina	µg PBG cons. / mg proteina
Homogenato	p	T	T	0,0286	1,447
	p	F	F	0,0596	1,939
	s	T	T	0,0633	1,283
	s	F	F	0,0675	1,256
Sobrenadante	p	T	T	0,328	5,118
	p	F	F	0,335	4,813
	s	T	T	0,079	1,990
	s	F	F	0,080	2,553
Pellet	p	T	T	0,217	1,455
	p	T	F	0,267	2,289
	p	F	T	0,275	2,484
	p	F	F	0,325	2,940
	s	T	T	0,212	1,739
	s	T	F	0,592	1,952
	s	F	T	0,277	1,791
	s	F	F	0,528	2,248

El sistema de incubación fue similar al standard descripto en Métodos. La atmósfera anaeróbica. Se empleó *Euglena* crecida a la luz, cosechada a los 6 días.

(+) p= con potter de vidrio ; s= sonicación durante 30"

(++) Buffer 0,05 M pH 7,4 de F= Fosfato ó T= Tris-ClH

I.- 4.- OBSERVACION DE LOS CULTIVOS DE CELULAS VIVAS DE EUGLENA Y DE HOMOGENATOS AL MICROSCOPIO:

A esta altura cabría mencionar que se llevaron a cabo observaciones de distintos preparados de Euglena gracilis al microscopio óptico (600x). En los cultivos frescos se pudo apreciar perfecta y claramente su color,forma alargada y flagelada, con gran número de estructuras interiores; sus movimientos sumamente rápidos, al mismo tiempo se verificó que no había ningún tipo de contaminación. En algunos casos, se pudo ver que cuando la célula está por morir, se redondea y alarga intermitentemente sin desplazarse, una vez muerta es completamente redonda e inmóvil. En los cultivos utilizados prácticamente no se encontraban células muertas.

La observación de los homogenatos obtenidos por sonicación mostró que todas las células habían sido destruídas, apareciendo estructuras redondeadas, inmóviles y vacías, productos de una desintegración celular.

I.- 5.- TIEMPO DE SONICACION:

Hasta aquí el método de homogeneización por ultrasonido parecía producir preparaciones enzimáticas activas, era sin embargo necesario analizar los efectos de la sonicación durante intervalos variables y sobrevolúmenes también diferentes de suspensión.

En cuanto al primer aspecto, empleand fracciones de 6-8 ml y manteniendo siempre la temperatura abajo de 5°C, se sonicaron por espacio de 30 segundos cada vez, con intervalos de 1 minuto entre cada tratamiento, hasta un máximo de 120 segundos. Los resultados se ilustran en la Figura 63; se observa que la cantidad de proteínas no varió significativamente en las diferentes fracciones, en cuanto a la actividad es mayor al tiempo de sonicación de 30 segundos, siendo esto más notorio cuando se expresa en función de las porfirinas formadas. El contenido de clorofila también fué menor a los 30 segundos de sonicación. Cabe agregar que usando buffer Tris se obtuvieron resultados similares. En consecuencia se establece como tiempo de sonicación standard el de 30 segundos.

Por otro lado, se realizó luego un estudio comparativo de las actividades resultantes cuando se sonicaban diferentes volúmenes de suspensión de células. En la Figura 64 se ilustran los datos obtenidos para los homogenatos y pellet provenientes de ensayos empleando 6-8 ml y 2 ml por vez. Aparentemente usando volúmenes menores se extrae más proteínas, sin embargo las preparaciones son mucho más activas tratando fracciones de 6-8 ml, el uso de volúmenes mayores que estos también dió valores de actividades inferiores a los de 6-8 ml. De allí que se decidió standarizar el volumen en 6-8 ml.

I.- 6.- RELACION DEL PESO DE CELULAS AL VOLUMEN DE BUFFER DURANTE LA EXTRACCION:

En trabajos previos de nuestro laboratorio ya sea empleando callos de soya o también Euglena se había encontrado que la relación del peso de tejido al volumen del buffer era, en el casode algunas enzimas del camino del hemo, de

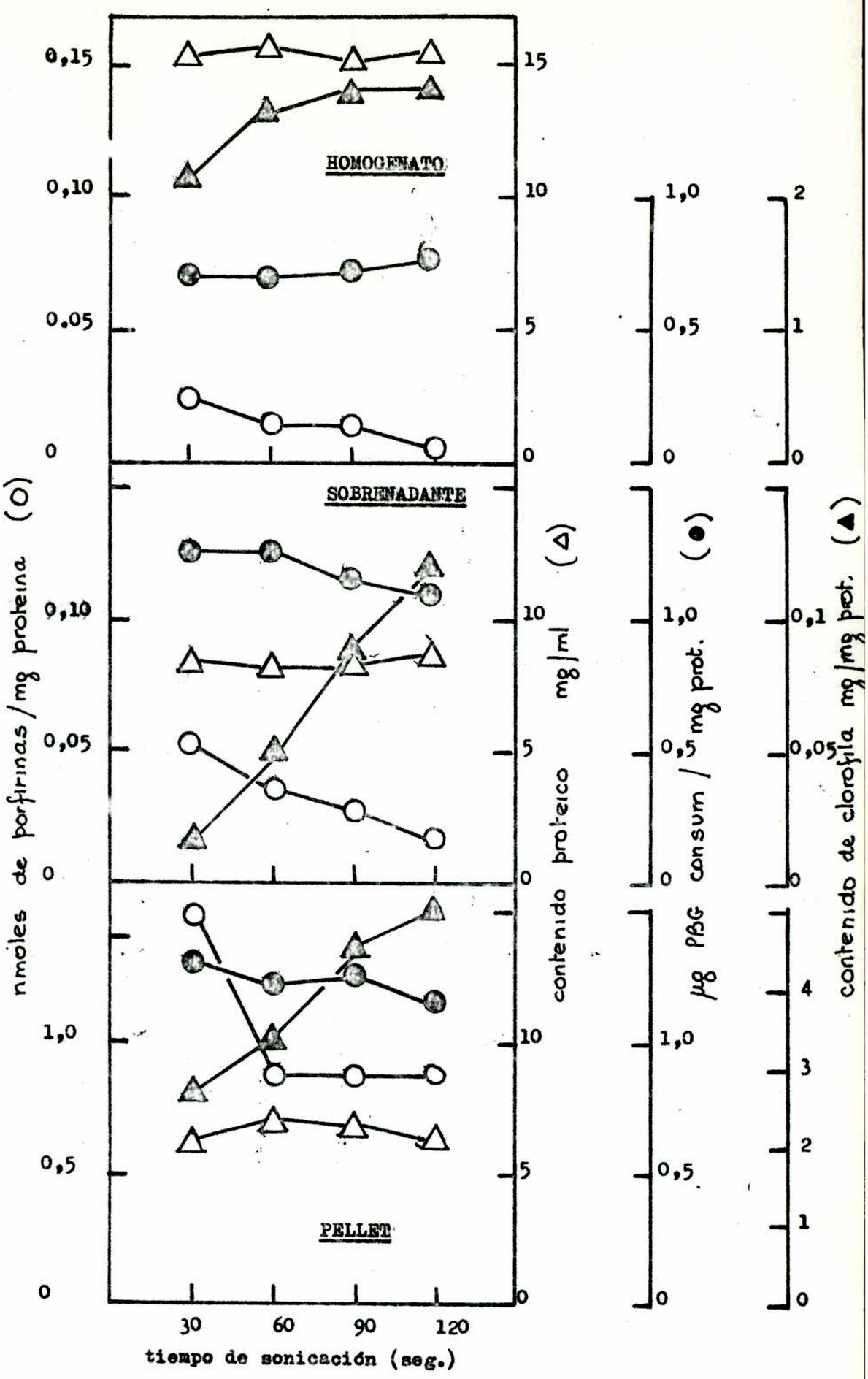


Figura 63: Tiempo de sonicación óptimo. El sistema de incubación y las condiciones fueron análogas a las descriptas en Métodos. Se empleó Euglena crecida en la luz, cosechada a los 6 días. Los valores graficados son promedios de 5 experiencias.

significativo importancia, en cuanto a ciertos parámetros tales como contenido protéico, de clorofila y particularmente actividad enzimática (Wider de Xifra et al, 1971; Stella y Batlle, resultados no publicados), de manera que se consideró necesario investigar también este aspecto en nuestro caso, analizándose al mismo tiempo si en el casode existir una determinada relación óptima, lo realmente importante era que esa relación fuese la de la suspensión originalmente sonicada, o si los resultados no se modificaban partiendo de una dada relación, efectuando luego la o las diluciones pertinentes para llevar a cabo la incubación.

Para ello se efectuaron suspensiones de células frescas en buffer fosfatos en las relaciones 1:1, 1:2 y 1:3, que se sonicaron durante 30 segundos Una alícuota de la primera se diluyó hasta 1:2 y 1:3 y una alícuota de la segunda hasta 1:3. Se muestran algunos resultados obtenidos en la Figura 65 y en la Tabla VIII. De allí surge que la relación 1:2 es la más conveniente, los datos de actividad correspondientes a las fracciones homogenato y sobrenadante concordaron con los obtenidos para pellet (Figura 65). Además es interesante notar que lo importante es que la relación 1:2 exista en la suspensión original, aún luego de su dilución a 1:3 se conservan los mismos valores de actividad. Con la 1:3 inicial los datos son un 30% menores, en tanto que para la 1:1 o aún sus diluciones a 1:2 y 1:3 la diferencia es todavía mucho mayor. En cuanto a la proteína y clorofila extraídas vemos que de la primera pasa en general, una mayor parte al sobrenadante en tanto que por el contrario, el pellet retiene prácticamente todo el pigmento. En consecuencia se continuó empleando la relación de extracción usada hasta ese momento, es decir 1 gm de células cosechadas (peso húmedo) por cada 2 ml de buffer fosfato.

I.- 7.- IMPORTANCIA DEL LAVADO DE LAS CELULAS DURANTE SU COSECHA:

Se llevaron a cabo comparativamente determinaciones de actividad enzimática en las distintas fracciones H, S y P obtenidas a partir de células cosechadas directamente por centrifugación y lavadas por resuspensión en buffer fosfatos, antes de la preparación del homogenato según las condiciones ya standarizadas. En la Figura 66 y en la Tabla IX se ilustran los resultados obtenidos. Tanto para los datos de actividades enzimáticas como para el contenido proteico y de clorofila, no se encontraron diferencias significativas. Puede agregarse que tampoco las hubo en cuanto al tipo de porfirinas formadas, que correspondió al ya observado y comentado en experiencias anteriores.

De acuerdo con ésto, no se justificaría llevar a cabo el lavado de las células luego de su cosecha, de manera que se continuó empleando la Euglena cosechada directamente por centrifugación para su posterior homogeneización.

I.- 8.- EFECTO DEL USO DE INOCULOS CRECIDOS EN LUZ Y OSCURIDAD PARA EL DESARROLLO DE CULTIVOS DE EUGLENA EN OSCURIDAD SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA:

Era asimismo de interés averiguar si tenía alguna influencia el empleo de inóculos de Euglena en agar crecidos en la luz o en la oscuridad (que

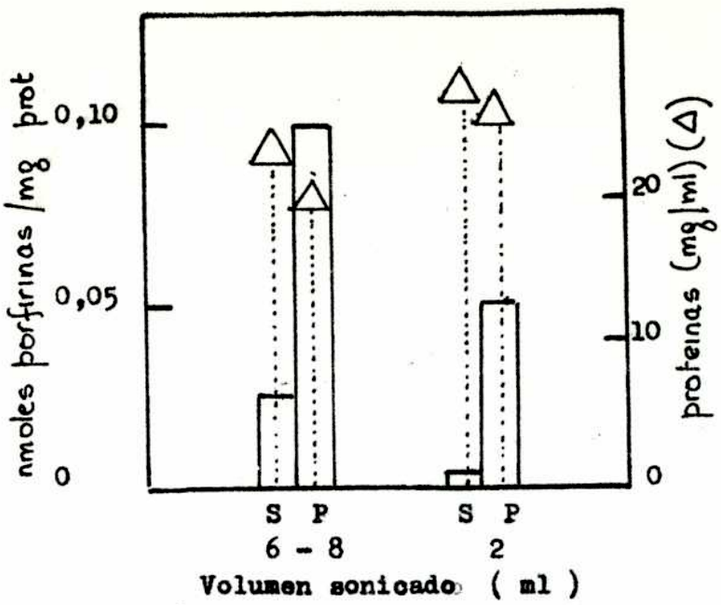


Figura 64: Efecto del volumen sonicado. Las condiciones experimentales son las mismas que las indicadas en la Figura 63, excepto que el tiempo de sonicación fue de 30".

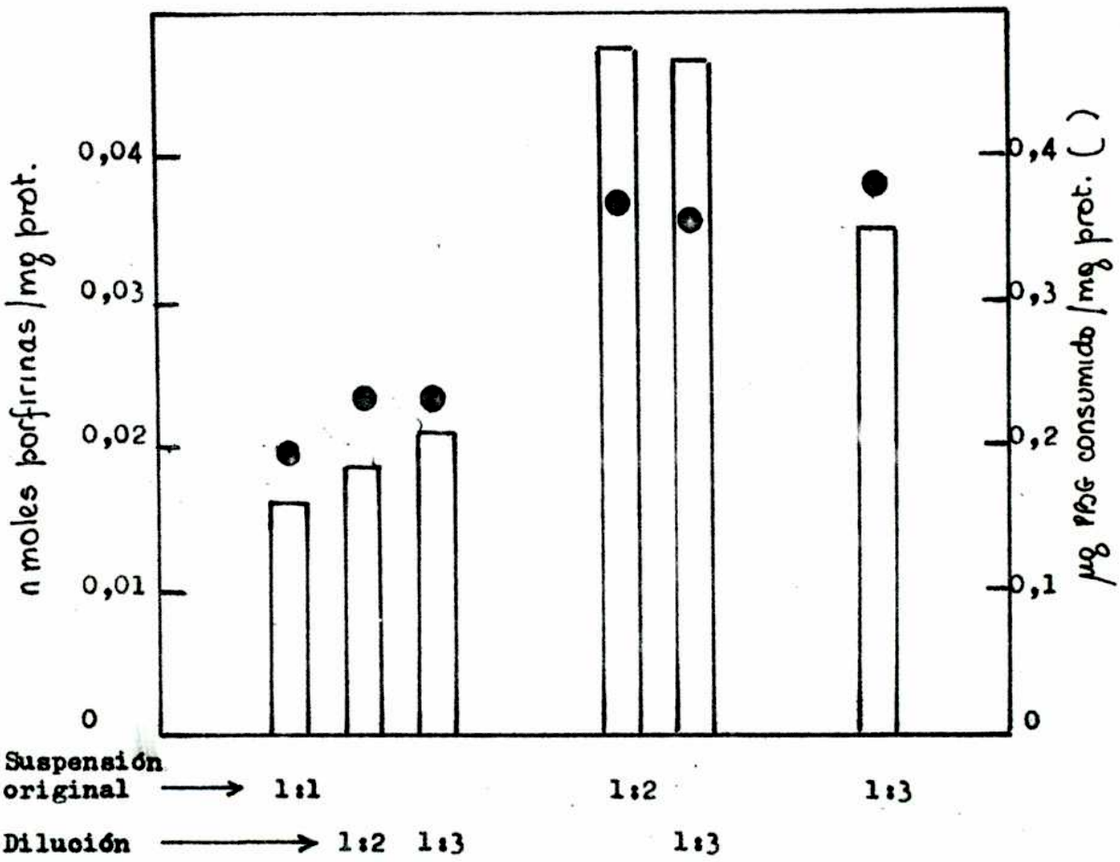


Figura 65: Efecto de la relación de peso de células a volumen de buffer, durante la extracción. Las condiciones experimentales son las standard. Se muestran datos promedios de 5 experiencias, obtenidos con la fracción pellet de Euglena crecida en la oscuridad, cosechada a los 6 días.

Tabla VIII Contenido de clorofila y proteico en las distintas fracciones obtenidas a partir de suspensiones en diferentes relaciones de peso de células a volumen de buffer.

Relación durante la extracción peso células : volumen buffer (gm : ml)	Fracción enzimática					
	Homogenato		Sobrenadante		Pellet	
	Proteina mg/ml	Clorofila mg/mg prot	Proteina mg/ml	Clorofila mg/mg prot	Proteina mg/ml	Clorofila mg/mg prot
1 : 1	52,38	0,00318	38,90	0,00054	23,86	0,00306
1 : 2	41,66	0,00669	23,14	0,00030	20,35	0,00656
1 : 3	27,19	0,00553	19,95	0,00070	7,53	0,00616

Las condiciones experimentales son las mismas que las indicadas en la leyenda de la Figura 65 .

Tabla IX Efecto del lavado de las células cosechadas sobre el contenido proteico y de clorofila

Fracción enzimática	Células sin lavar		Células lavadas	
	mg proteina / ml	mg clorofila / mg proteina	mg proteina / ml	mg clorofila / mg proteina
H	48,83	1,464	46,76	1,656
S	27,32	0,018	24,03	0,021
P	18,25	1,621	17,65	2,214

Las condiciones experimentales son las mismas que las indicadas en la leyenda de la Figura 66.

es nuestra fuente stock del organismo, como se menciona en Materiales y Métodos), para su repique a los frascos de cultivo en medio líquido, luego crecidos por ejemplo en la oscuridad (Figura 67). Para ello se determinaron entonces comparativamente (frascos y tubos) como siempre, actividades enzimáticas, contenido proteico y de clorofila en las tres fracciones provenientes de Euglena desarrollada en la oscuridad, proveniente de los dos inóculos de agar.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 67; no se observaron diferencias significativas, excepto en cuanto al contenido de clorofila, que de todas maneras son muy bajas; notemos que las cifras son del orden de 10^{-4} mg/mg proteína, de manera que en la escala del gráfico la diferencia está sólo magnificada, de manera que no la consideraremos de importancia. No hubo cambios tampoco en cuanto al tipo de porfirinas formadas. Los resultados con homogenato y sobrenadante fueron análogos a los ilustrados con pellet.

En consecuencia se continuó empleando como se venía haciendo, inóculos de Euglena en agar crecidos a la luz para cualquier tipo de repique y desarrollo posterior en medios líquido o sólido.

I.- 9.- CONTROL DEL PROCEDIMIENTO EMPLEADO PARA LA SEPARACION DE LOS PRODUCTOS FORMADOS Y SUSTRATO REMANENTE AL FINAL DE LAS INCUBACIONES:

Teniendo en cuenta experiencias previas empleando este mismo tejido y algunos otros, se sabía que la forma más conveniente de detener la reacción enzimática y recuperar al máximo los productos formados era la de precipitar las proteínas con TCA 25%, oxidar a la luz 20 minutos, separar el precipitado por filtración, lavarlo tres veces con 1 ml de TCA 5% y reunir el primer filtrado y los tres lavados. Sin embargo, es conocido que particularmente las Uroporfirinas se adsorben fuertemente a los precipitados protéicos, de manera que en algunos casos, como por ejemplo en eritrocitos de aves o humanos y de conejos, según nuestra propia experiencia, su recuperación es más dificultosa y no cuantitativa.

Nos pareció entonces también de importancia, confirmar que las condiciones hasta ese momento empleadas, eran efectivas y óptimas para nuestro caso. Para ello se llevaron a cabo varias experiencias adicionales, separando el precipitado proteico obtenido del tratamiento con TCA 25% luego de la oxidación por a) filtración o b) centrifugación en batch según se describió en Métodos. Solamente recordemos que en el primer caso el precipitado se lavó con TCA 5% separando los lavados también por filtración, reuniéndolos en dos grupos de tres lavados cada uno. En el segundo caso, tanto el primer sobrenadante como los lavados se separan por centrifugación; se hicieron cuatro lavados reunidos en dos grupos de dos lavados cada uno. Cabe notarse que en todos los casos siempre se controló cada lavado por fluorescencia, lo cual nos llevó a agruparlos en la forma señalada.

En las Tablas X y XI se muestran los resultados obtenidos; como es de esperar la mayor cantidad de porfirinas y PBG se encuentran en los sobrenadantes originales, disminuyendo por lógica progresivamente en los lavados. Comparando los valores de la Tabla XI por ejemplo, no se aprecian diferencias

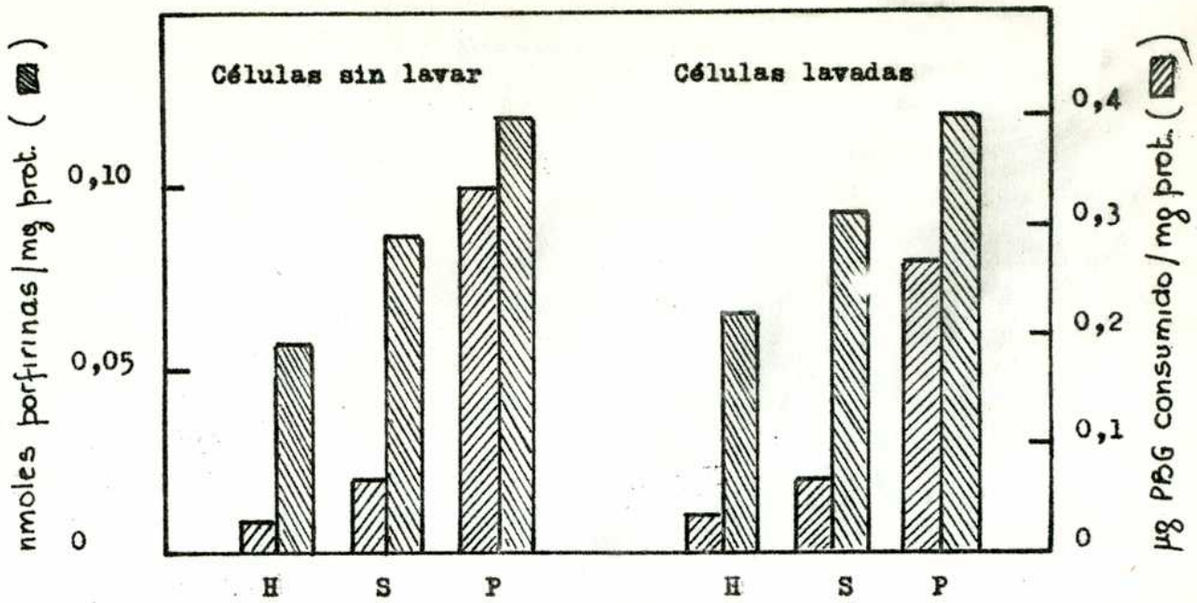


Figura 66: Efecto del lavado de las células cosechadas, sobre la actividad enzimática. Las condiciones experimentales son las standard ya descriptas Se empleó Euglena crecida en la luz, cosechada a los 6 días. Los datos graficados son promedios de 3 experiencias.

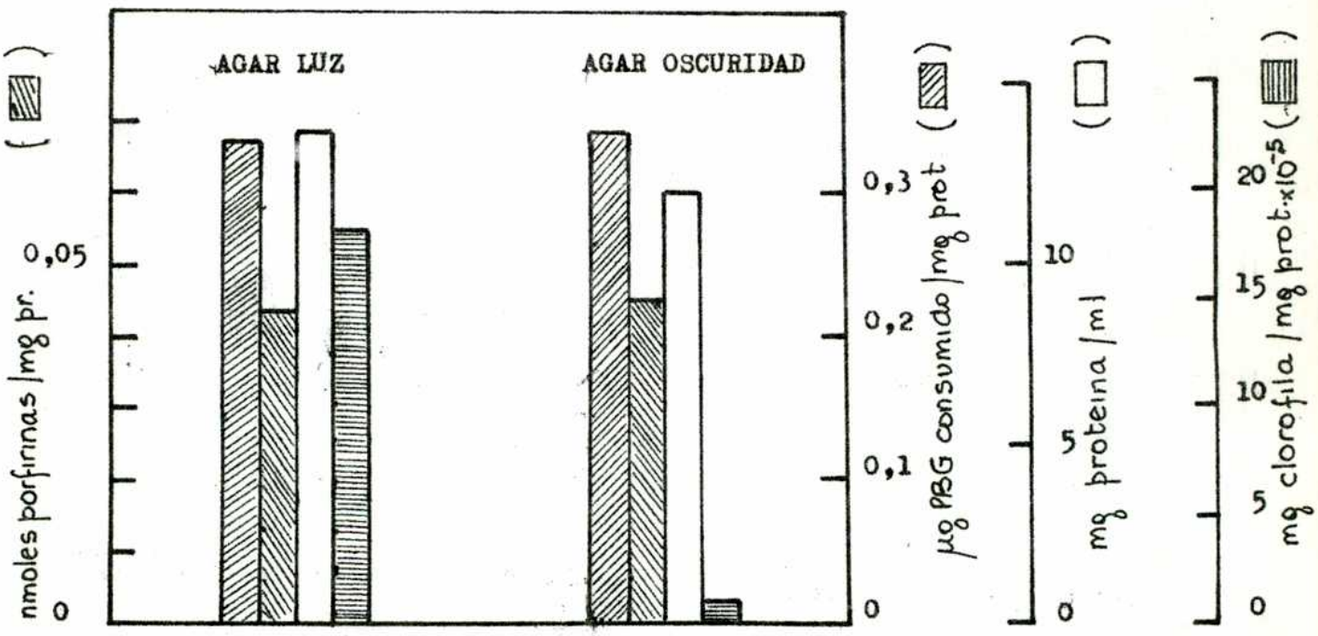


Figura 67: Efecto de diferentes condiciones de crecimiento del inóculo de ágar (luz u oscuridad) sobre las actividades enzimáticas, contenido proteico y de clorofila. Las condiciones experimentales son las standard. Se empleó Euglena crecida en la oscuridad, cosechada a los 4 días, proveniente de inóculos de agar luz o de agar oscuridad. Se grafican los datos obtenidos para la fracción pellet, promedios de 3 experiencias.

Tabla X : Efecto comparativo del empleo del método de lavado por filtración ó centrifugación (batch), sobre la recuperación de producto formado y sustrato remanente.

Fracción enzimática	Método de lavado			
	Filtración		Batch	
	nmoles porfirina / mg proteína	µg PBG rem. / mg proteína	nmoles porfirina / mg proteína	µg PBG rem. / mg proteína
H_{or}	0,365	0,285	0,223	0,400
H_1	0,214	0,110	0,256	0,210
H_2	0,199	0,065	0,158	0,105
S_{or}	0,019	0,190	0,021	0,105
S_1	0,018	0	0,024	0,050
S_2	0,020	0	0,015	0
P_{or}	3,731	2,090	3,882	3,485
P_1	0,909	0,100	1,315	0,860
P_2	0,460	0,100	0,762	0,875

Las condiciones experimentales son las standard. Se usó *Euglena* crecida en la luz. Los subíndices que acompañan cada fracción significan

or: sobrenadante original 1: primer grupo de lavados

2: segundo grupo de lavados

Tabla XI : Efecto del método de lavado sobre las actividades enzimáticas del pool de los sobrenadantes y lavados reunidos.

Fracción enzimática	Método de lavado			
	Filtración		Batch	
	nmoles porfirina / mg proteína	µg PBG cons / mg proteína	nmoles porfirina / mg proteína	µg PBG cons / mg proteína
H	0,0102	0,2103	0,0077	0,2110
S	0,0039	0,3228	0,0040	0,3942
P	0,1667	0,4757	0,2033	0,3908

Las condiciones son las mismas que las indicadas en la Tabla X.

significativas entre ambos tratamientos. Tampoco las hubo en cuanto a los tipos de porfirinas formadas.

Cabe aclararse que con el empleo de HCl concentrado como agente precipitante seguido de una metodología análoga, la recuperación fué alrededor del 30% menor que con TCA.

En consecuencia, considerando además que el tiempo insumido al emplear el método del lavado en batch es considerablemente mayor, el proceso en sí más tedioso y no hay ventajas de importancia como por ejemplo, una recuperación mayor de Uroporfirinas, se continuó empleando la misma técnica usada hasta aquí de separación del sobrenadante y seis lavados de la proteina precipitada con 1 ml cada vez de TCA 5%.

I.- 10.- CONTROL DE POSIBLES INTERFERENCIAS EN LA MEDICION DEL PBG:

Como se ha señalado en Métodos en todas las determinaciones enzimáticas se llevan a cabo blancos de sustrato a tiempo cero con y sin proteína, y los correspondientes controles a los distintos tiempos de incubación, descontándose así en cada caso las porfirinas formadas no enzimáticamente. Un dato que llamó la atención al efectuar estos controles, fué que si bien el PBG consumido era nulo a tiempo cero en los blancos con buffer no ocurría lo mismo cuando se le agregaba proteína proveniente de las distintas fracciones enzimáticas. Estos resultados podrían hacer pensar en la presencia de alguna clase de interferencia de la reacción de Ehrlich en la proteína, o bien a un muy rápido consumo del sustrato, un fenómeno que también se ha observado empleando las enzimas de callos de soya (Llambías y Batlle, datos no publiados), esta posibilidad se investigó más adelante; pero era importante determinar si había o no algún componente en las fracciones que diera datos falsos en la medición del PBG. Para ello se estudió el efecto de la proteína. De los resultados que se muestran en la Tabla XII se comprueba que la preparación en sí no afecta la determinación del pirrol. Empleando homogenato y pellet los datos fueron similares.

Por otro lado, se sospechaba que podrían encontrarse compuestos sulfhidrílicos en los extractos, varios derivados tiólicos suelen interferir en la reacción de Ehrlich, de allí que con el objeto de excluir esta otra posible causa de error se efectuaron una serie de experiencias con blancos a tiempo 0 y 4 horas de incubación, a 37°C en los cuales se precipitó la proteína 1) con TCA 25% (0,2 ml/ml); 2) con TCA 25% y 0,05 ml de solución saturada de SO_4Cu/ml de muestra y 3) con 0,05 ml/ml de la misma solución de SO_4Cu.

Los resultados se ilustran en la Tabla XIII; no había diferencias significativas, de manera que se continuó utilizando la precipitación con TCA 25% y aparentemente entonces la medición del PBG no estaría alterada por la presencia de inhibidores de la reacción de Ehrlich.

Tabla XII Efecto de la proteína enzimática sobre la reacción de Ehrlich

Composición de la mezcla de reacción	$A_{555\ nm}$	µg PBG
1. PBG + agua	0,220	100
2. PBG + sobrenadante	0,198	89,2
3. agua	0,030	—
4. buffer + sobrenadante	0,015	—

En 1. se colocaron 0,1ml de una solución de PBG (1mg/ml) y 0,9 ml de agua

En 2. se colocaron 0,1ml de una solución de PBG (1mg/ml) y 0,9 ml de sobrenadante.

En 3. 1 ml de agua.

En 4. 0,1 ml de buffer fosfato y 0,9 ml de sobrenadante.

Tabla XIII Efecto de la precipitación de la proteina enzimática con TCA, SO_4Cu y mezcla de ambos

Sistema incubado	agente precipitante	nmoles porfirinas totales	µg PBG consumido totales
Buffer	1	0,0190	2,05
	2	—	1,78
	3	—	1,94
Homogenato	1	0,0602	2,01
	2	—	2,58
	3	—	2,48
Sobrenadante	1	0,0121	2,32
	2	—	2,63
	3	—	1,40
Pellet	1	0,0715	2,01
	2	—	2,13
	3	—	2,16

El sistema de incubación fue el standard, sólo que empleando 10 ug de P

Se empleó *Euglena* crecida en la luz, cosechada a los 6 días.

Al terminar la incubación tanto en el blanco de Buffer, como en las 3 fracciones las proteínas se precipitaron con el agente descripto en el texto. 1= TCA ; 2= TCA + SO_4Cu ; 3= SO_4Cu.

I.- 11.- EFECTO DE SALES DE SODIO Y MAGNESIO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA:

Teniendo en cuenta que en otros tejidos (Llambías y Batlle, 1971 a,b; Sancovich y Batlle, resultados no publicados) se había encontrado que la presencia de iones Na y Mg a ciertas concentraciones producían en particular una inhibición del sistema de las Decarboxilasas, y al mismo tiempo un incremento en la actividad de la PBGasa, como evidentemente citamos partiendo de preparaciones muy ricas de las primeras enzimas, excepto el pellet, y entre nuestros propósitos se encuentra aportar mayores evidencias experimentales sobre la conversión enzimática del PBG en Uroporfirinógenos y la purificación del complejo enzimático involucrado y sus componentes, se llevaron a cabo una serie de ensayos tendientes a determinar si dichos iones poseían efectos similares sobre las enzimas de Euglena. Para ello se realizaron ensayos paralelos con y sin el agregado de sales. Los resultados obtenidos para pellet se ilustran en la Figura 68, en la cual se puede ya ver que hay una gran variación de la actividad enzimática con los días de crecimiento y las condiciones de iluminación que no parecen responder a un patrón regular. Lo mismo sucedió usando homogenato y sobrenadante. Sin embargo en general, excepto a los días 4, 6 y 7, en oscuridad, no hay grandes diferencias en cuanto a la presencia o no de las sales, en base a las porfirinas totales formadas; un perfil análogo resultó de medir el consumo de sustrato. Era importante hacer un análisis del tipo de las porfirinas formado que reveló que tampoco había variaciones significativs entre los incubados con o sin el agregado de ClNa y Cl_2Mg, apareciendo los patrones usuales para cada fracción.

Estos resultados no son tan claros como los anteriores, pero lo que sí fué evidente es que la mezcla de sales por lo menos en estas condiciones, no ejercía efecto alguno sobre las Decarboxilasas, como esperábamos; de manera que se continuó empleando el sistema de incubación usado de costumbre, sin la adición de otros componentes.

I.- 12.- EFECTOS DE LA ILUMINACION Y LOS DIAS DE CRECIMIENTO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA:

Es conocido que en ciertos organismos la actividad de algunas de las enzimas del camino de los tetrapirroles varía con la edad del cultivo (Xifra et al, 1971; Batlle et al, 1975a; Stella y Batlle, resultados no publicados) y asimismo con las condiciones de iluminación de los mismos (Llambías y Batlle, 1971a; Batlle et al, 1975a, 1975b, 1976; Stella y Batlle, resultados no publicados).

Se decidió entonces estudiar la actividad de nuestro sistema enzimático, en función de los días de crecimiento, en presencia o ausencia de luz, empleando como preparación la fracción pellet. Los resultados obtenidos se encuentran en las Figuras 69 y 70.

Antes de su análisis es importante señalar que las distintas experien-

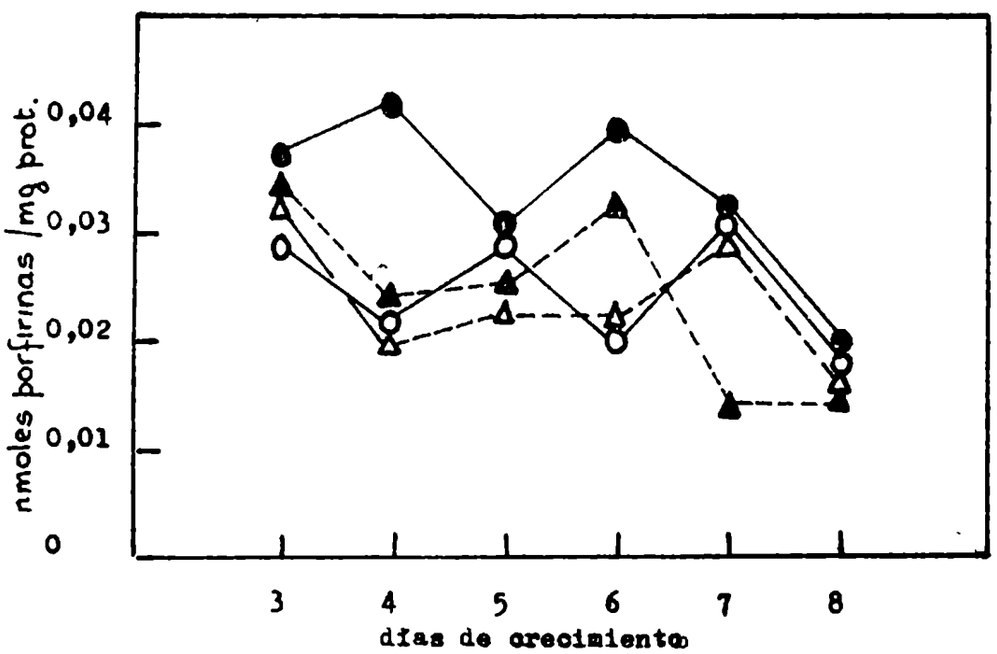


Figura 68: Efecto de las sales de Na y de Mg sobre la actividad enzimática. Las condiciones experimentales son las standard, excepto que se empleó pellet de células frescas de Euglena crecidas a la luz (o,Δ) u oscuridad (●,▲), cosechadas a días diferentes, y que la mezcla de incubación contenía sólo enzima y sustrato (o, ●) o se le había agregado ClNa 0,6M : Cl_2Mg 0,12M (1:1) en la proporción de 0,1 ml/ml de incubado (Δ,▲).

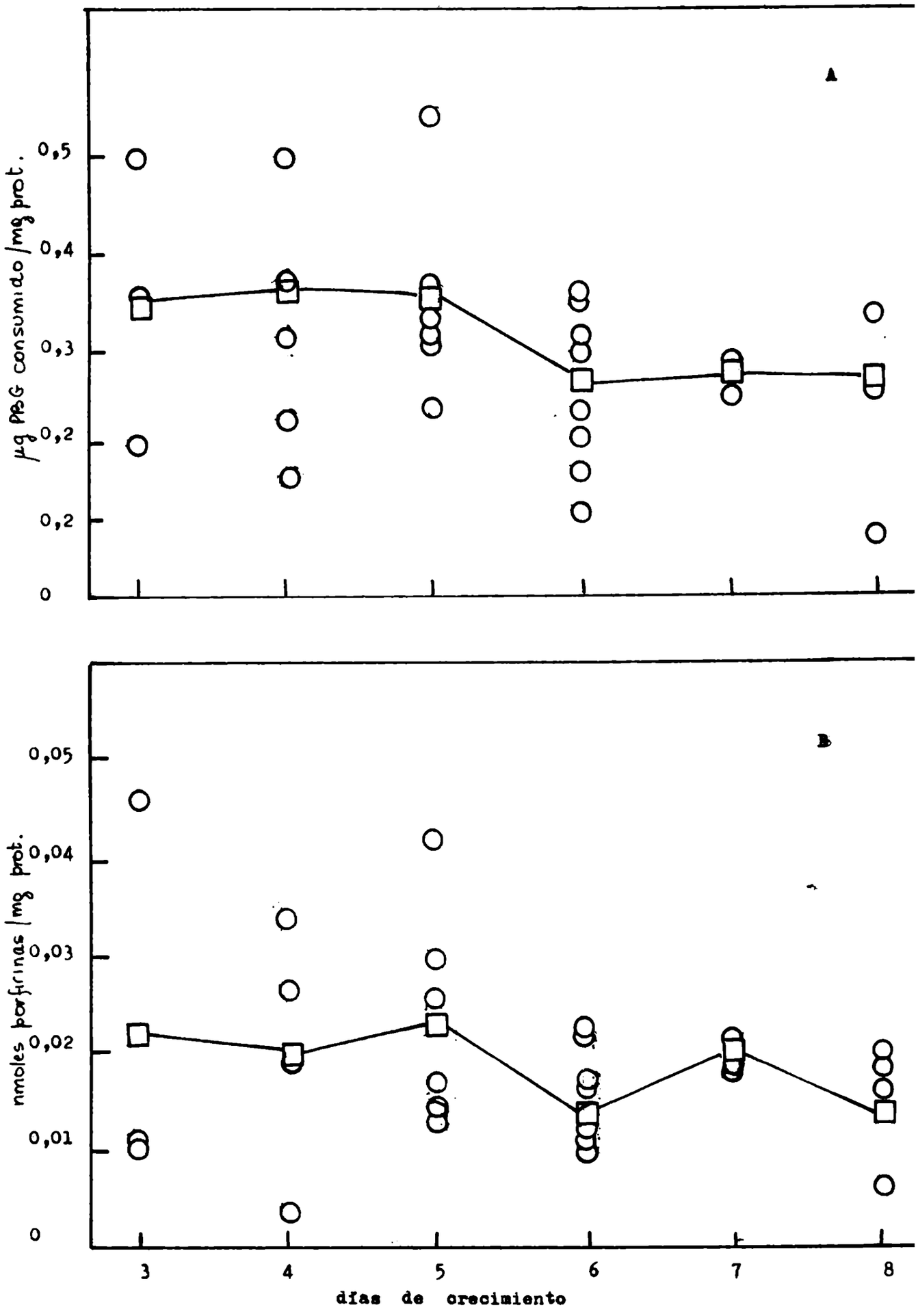


Figura 69: Actividad enzimática en función de los días de crecimiento en la luz. Las condiciones experimentales son las standard. La fracción empleada, pellet. En A , la actividad se expresa en función del sustrato consumido, en B; en función del producto formado. o = valores obtenidos en experiencias diferentes □ = valores promedios.

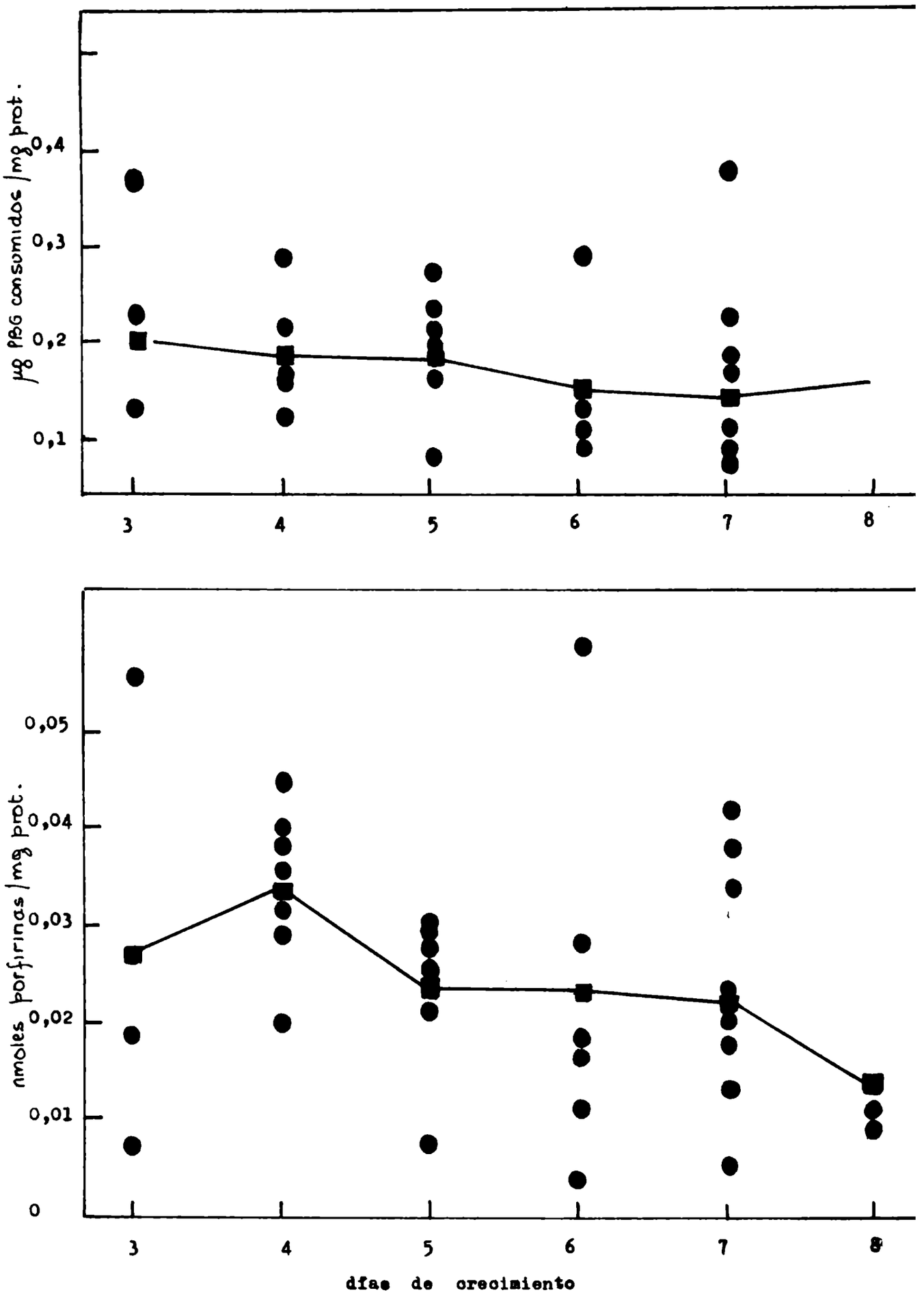


Figura 70: Actividad enzimática en función de los días de crecimiento en la oscu-
ridad. Las condiciones son las mismas que las indicadas en la Figura 69 . : va-
lores obtenidos en diferentes experiencias; ■ : valores promedios.

cias (10) se llevaron a cabo en el término de 3-4 meses, apreciándose y este hecho se ha repetido anualmente, que hacia los meses de verano, ocurre un aumento general de la actividad; ello explica en parte, la notable dispersión de los datos que en este caso hemos representado en su totalidad para evidenciar precisamente este fenómeno. Sin embargo, de los valores medios surgiría que en nuestro caso, no se aprecia una variación significstiva de la actividad enzimática en función de los días de crecimiento. En base al sustrato consumido sería ligeramente superior en luz que en oscuridad (Figuras 69A y 70A), en cuanto al producto formado, durante los primeros días sería mayor en oscuridad, encontrándose la mayor diferencia en el cuarto y sexto día. En consecuencia, como ya al cuarto día de desarrollo se ha formado una buena masa de Euglena, teniendo en cuenta estos datos, bajo una u otra forma de iluminación, se decidió cosechar las células luego de cuatro días de crecimiento.

I.- 13.- CONTENIDO DE PROTEINAS Y CLOROFILA EN PELLET Y CELULAS FRESCAS, EN FUNCION DE LOS DIAS DE CRECIMIENTO Y CONDICIONES DE ILUMINACION:

En las mismas fracciones de pellet empleadas para la determinación de la actividad enzimática en función de los días de cultivo e iluminación se midió el contenido proteico y de clorofila; los datos obtenidos se muestran en las Figuras 71, 72, 73 y 74, donde nuevamente la dispersión de valores es notoria. De los valores medios para proteínas se aprecia que en la luz son oscilatorios (Figura 71), mientras que en oscuridad parecerían aumentar sólo ligeramente después del sexto día (Figura 72); aún así no podemos decir que los cambios sean significativos.

En cuanto a la clorofila, también en la luz el contenido es fluctuante (Figura 73). Lógicamente los valores en oscuridad son muchísimas veces menores (Figura 74). Si por otro lado comparamos los gráficos de la Figura 69B y de la Figura 73, y aún de la 70B y 74, vemos que existe, sin embargo una acentuada correspondencia entre los datos medios de actividad en base a porfirinas formadas y el contenido de clorofila, mayor en el caso de Euglena crecida en luz.

Un análisis del contenido proteico de las células cosechadas en función de los días de cultivo, nos muestra (Figura 75) que parecería haber una cantidad de proteína/gm de células, ligeramente mayor cuando la Euglena crece en la oscuridad, mientras que el contenido de clorofila también por gm de célula, es decir todas estas son determinaciones sobre el organismo recién cosechado, aumentaría con los días de crecimiento, tanto en luz como en oscuridad (Figura 76), si bien expresado por mg de proteína, en oscuridad decaería después del quinto día.

Como dijimos en el punto anterior, se seleccionó para la cosecha de las células el día 4, indistintamente de las condiciones de iluminación escogidas, aunque cabe agregarse aquí, que en base a estos resultados, y como frecuentemente la presencia de clorofila puede resultar un inconveniente según la

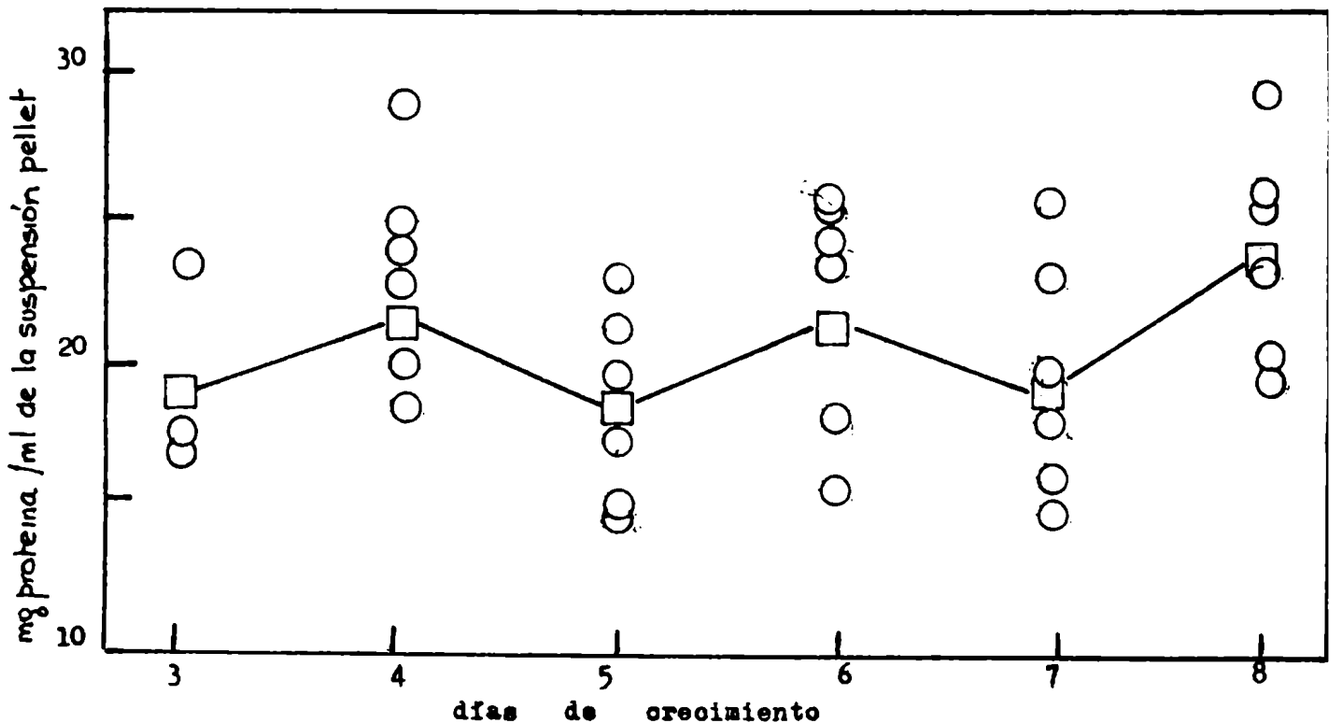


Figura 71: Contenido de proteinas , en la fracción pellet, en función de los días de crecimiento, a la luz. Las condiciones experimentales son las mismas que las indicadas en la Figura 69. O: valores obtenidos en diferentes experiencias; □: valores promedios

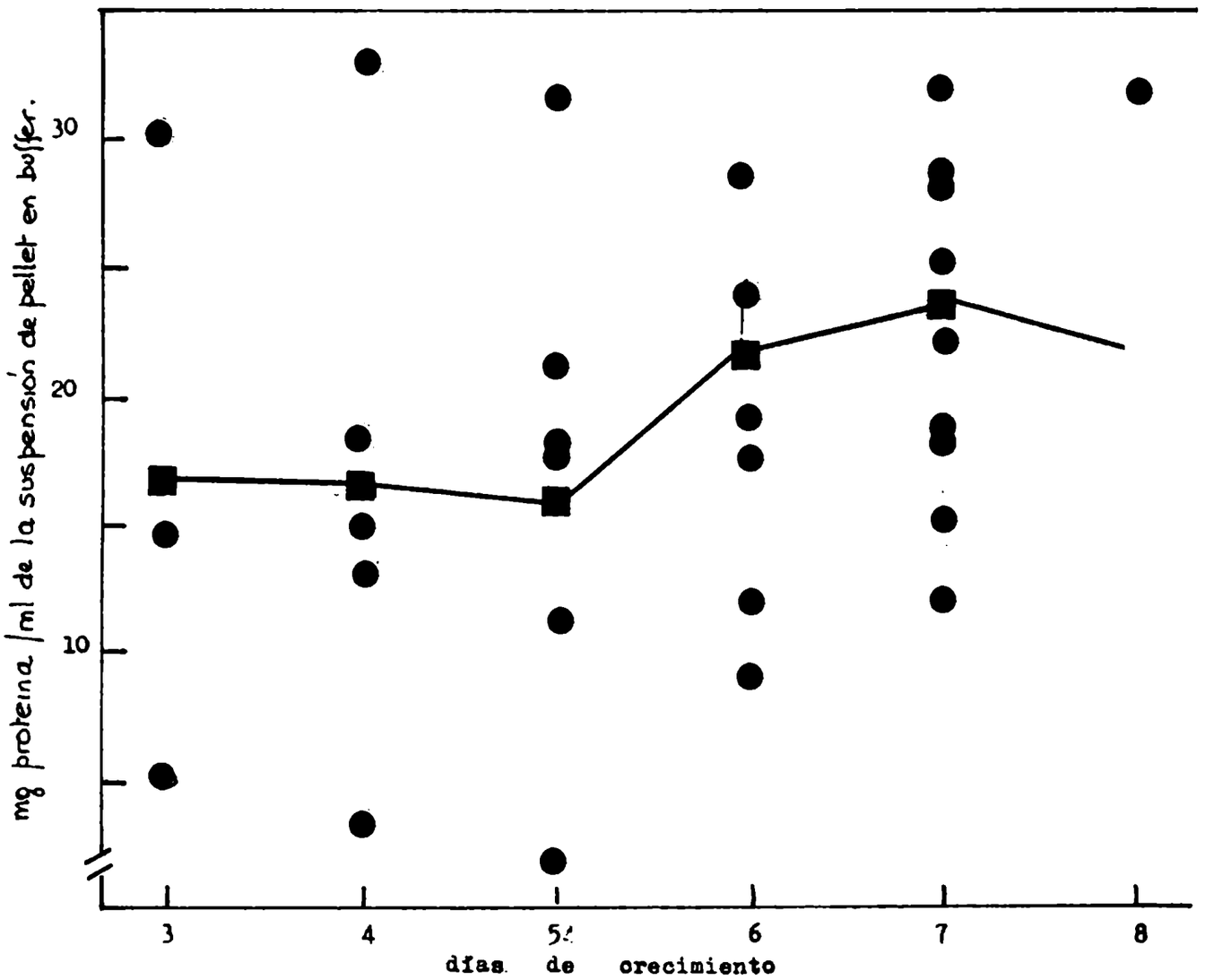


Figura 72: Variación del contenido de proteinas en la fracción pellet, en función de los días de crecimiento en la oscuridad. Las condiciones son las mismas que las indicadas en la Figura 69. ●: valores obtenidos en experiencias diferentes; : valores promedios

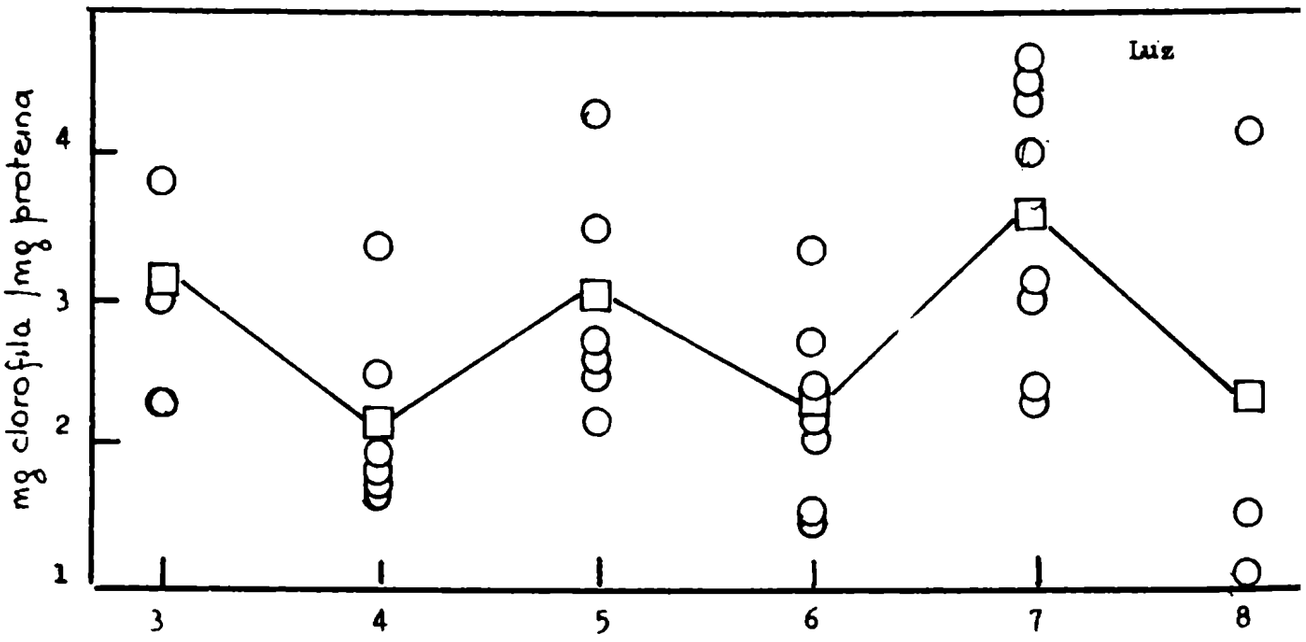


Figura 73: Contenido de clorofila en la fracción pellet, en función de los días de crecimiento. tanto las condiciones experimentales como los símbolos usados, so los ya indicados en la figura 69.

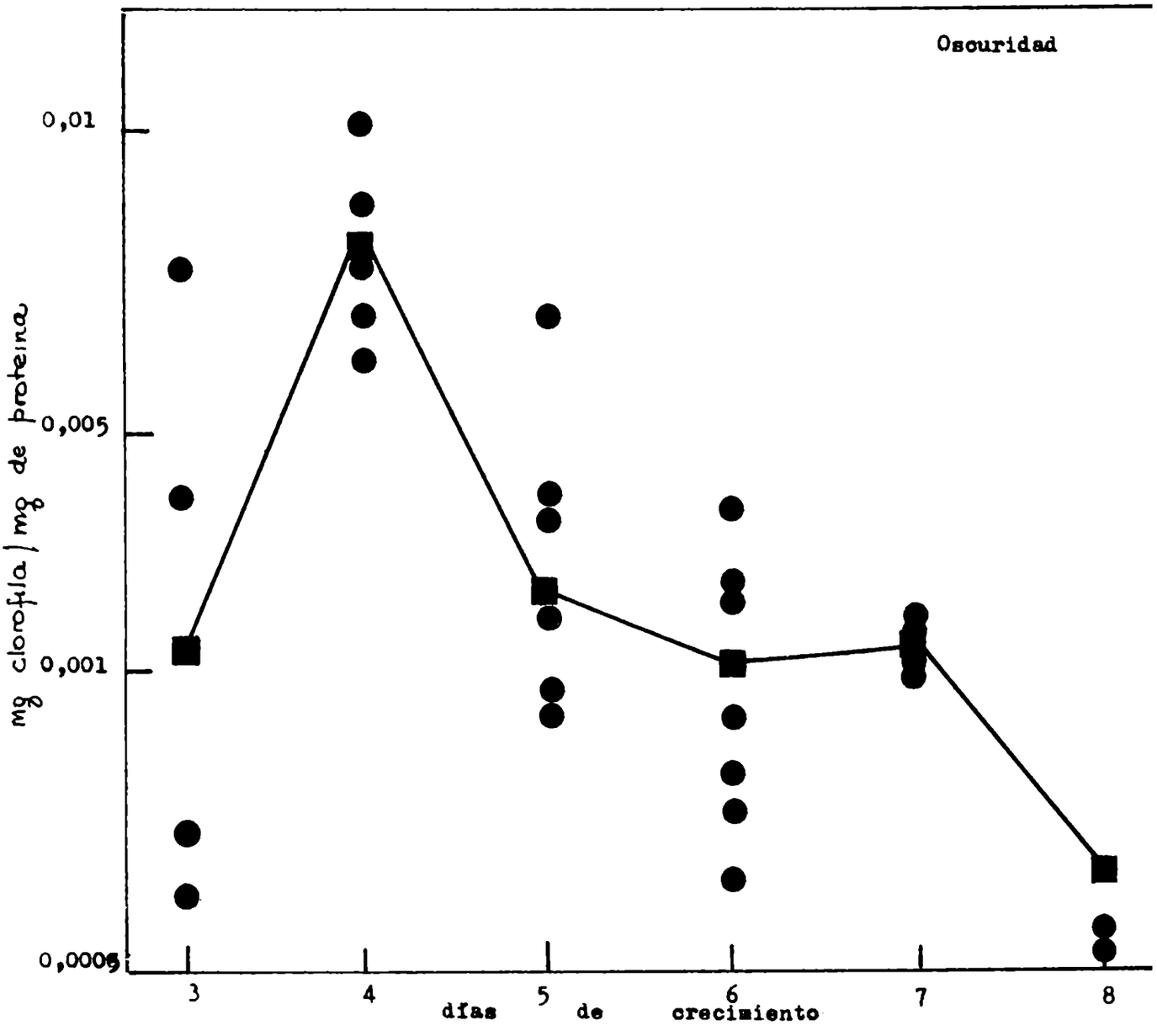


Figura 74: Contenido de clorofila, en la fracción pellet, en función de los días de c cimiento. Tanto las condiciones experimentales como los símbolos usados, son los mismo que los indicados en la Figura 69.

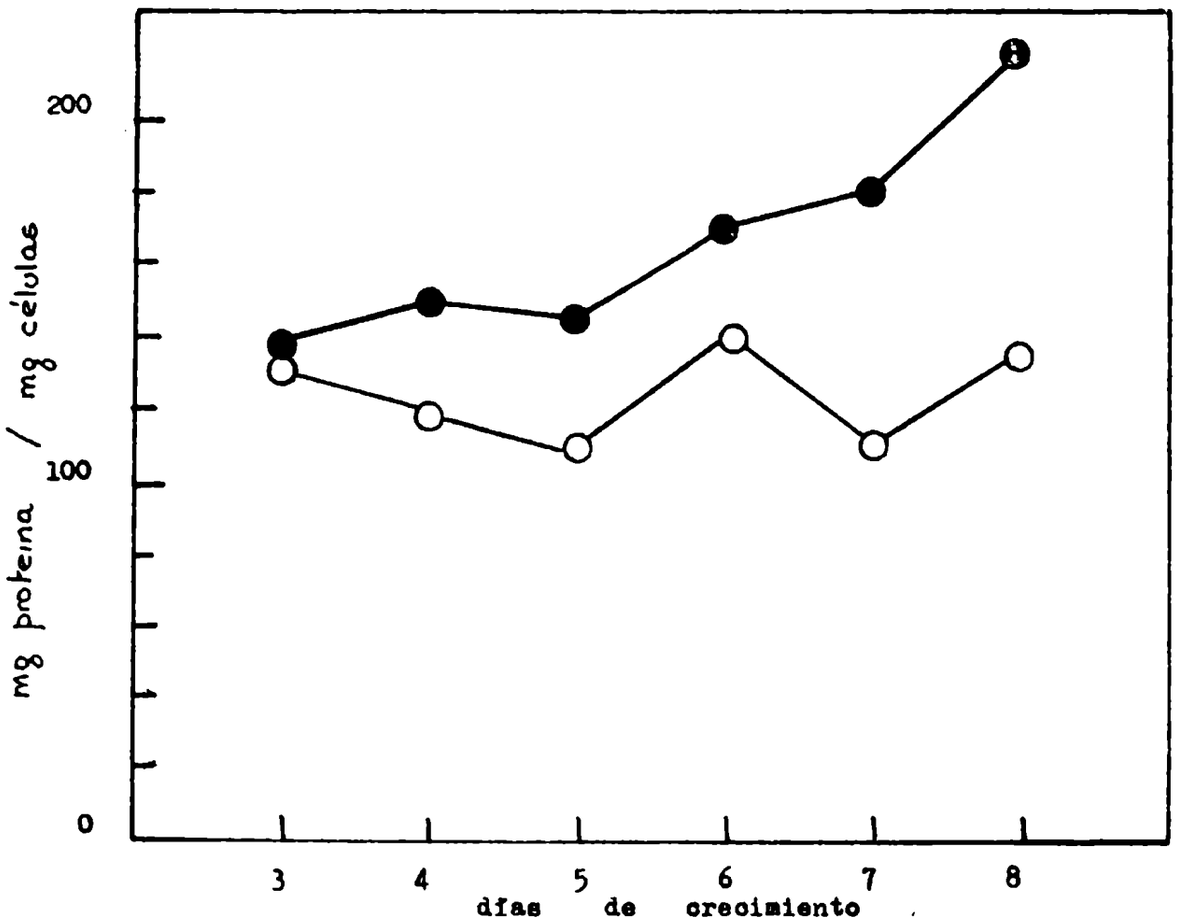


Figura 75: Contenido proteico en células frescas de Euglena, crecidas en la luz y oscuridad, en función de los días de crecimiento. Las condiciones experimentales son las standard. o: Euglena lus ; e: Euglena oscuridad. Se expresa el contenido de proteinas en mg por mg de células cosechadas (peso húmedo). Los datos son promedios de 7 experiencias.

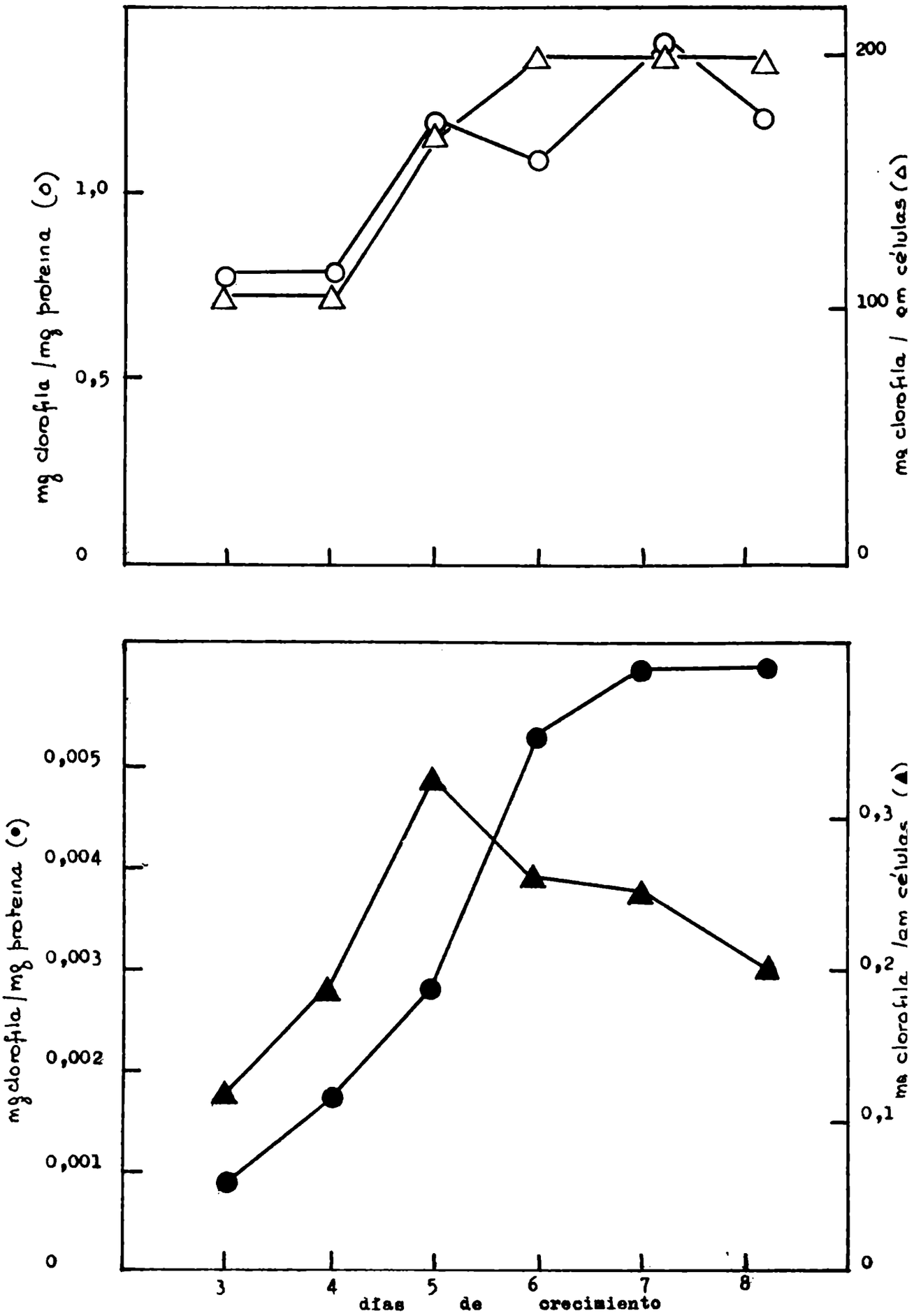


Figura 76: Contenido de clorofila en células frescas de *Euglena*, en función de los días de desarrollo del cultivo y de las condiciones de iluminación. Las condiciones experimentales son las standard. Se expresa el contenido de clorofila o bien en mg/mg de proteinas (o,•) o bien en mg/gm de células cosechadas (peso húmedo) (Δ,▲) crecidas en la luz (o,Δ) o en la oscuridad (•,▲). Los datos graficados son promedios de 7 experiencias.

experiencia, para la mayoría de los ensayos salvo se indique lo contrario, se decidió crecer Euglena en oscuridad, cosechándola por supuesto el cuarto día.

I.- 14.- ESTUDIO COMPARATIVO EMPLEANDO CELULAS FRESCAS Y POLVOS CETONICOS:

Por razones prácticas, una forma muy conveniente de mantener y disponer de un buen stock de material, es la de preparar el polvo cetónico a partir del tejido fresco. En nuestro laboratorio, esta ha sido una técnica frecuentemente empleada con callos de soya, bacterias y la misma Euglena, para el estudio de varias enzimas que conservan sus propiedades inalteradas por largo tiempo bajo esa forma. De manera que también nos pareció interesante, investigar la posibilidad de poder acumular células de Euglena como polvo cetónico, para lo cual fué necesario en primer lugar estudiar comparativamente el comportamiento de nuestro sistema obtenido de ambas fuentes.

Se reportarán entonces, los resultados de ocho experiencias en las cuales se midieron actividad, contenido proteico y de clorofila, naturaleza de los productos formados en células frescas y los polvos cetónicos de estas mismas células, crecidas cuatro días a la luz y a la oscuridad, empleando como siempre una atmósfera anaeróbica, durante las incubaciones enzimáticas.

En la Figura 77 se muestran los datos correspondientes a la determinación de las actividades específicas de las diferentes fracciones enzimáticas. Un análisis detallado de las mismas nos permite obtener las conclusiones que resumimos en la Tabla XIV acerca de la relación de actividades dentro de la misma fuente con respecto a las condiciones de iluminación según se expresen en función de porfirinas formadas o sustrato consumido.

Si comparamos ahora los datos para las diferentes fracciones obtenidas de cada fuente, por un lado en luz y por otro en oscuridad, vemos los resultados en la Tabla XV. Si ahora comparamos como en la Tabla XIV, las actividades relativas para las mismas fracciones entre sí pero comparándolas según vengan de tejido fresco o polvo cetónico, vemos los resultados en la Tabla XVI.

Aunque puede verse que en algunos casos los datos expresados en función de las porfirinas formadas o del sustrato consumido no son totalmente concordantes, en general podemos decir que existe una buena correlación para las distintas fracciones y afirmar, que en condiciones de incubación anaeróbica, empleando tejido fresco o polvo cetónico, no hay diferencias sustanciales para las mismas fracciones H, S y P, crecidas en la luz o en la oscuridad.

Sin embargo, un resultado sumamente interesante y de tener muy en cuenta, es que cuando trabajamos con tejido fresco las actividades de H y S son siempre mucho menores que en P; en otras palabras, la actividad del pellet de tejido fresco, sea crecido en luz u oscuridad, es mucho mayor que la de S y ésta a su vez que la de H (Tabla XV), como ya lo habíamos venido observando en todas las experiencias anteriores, pero ahora lo notable es que estas relaciones se invierten cuando partimos de los polvos cetónicos, en estos casos

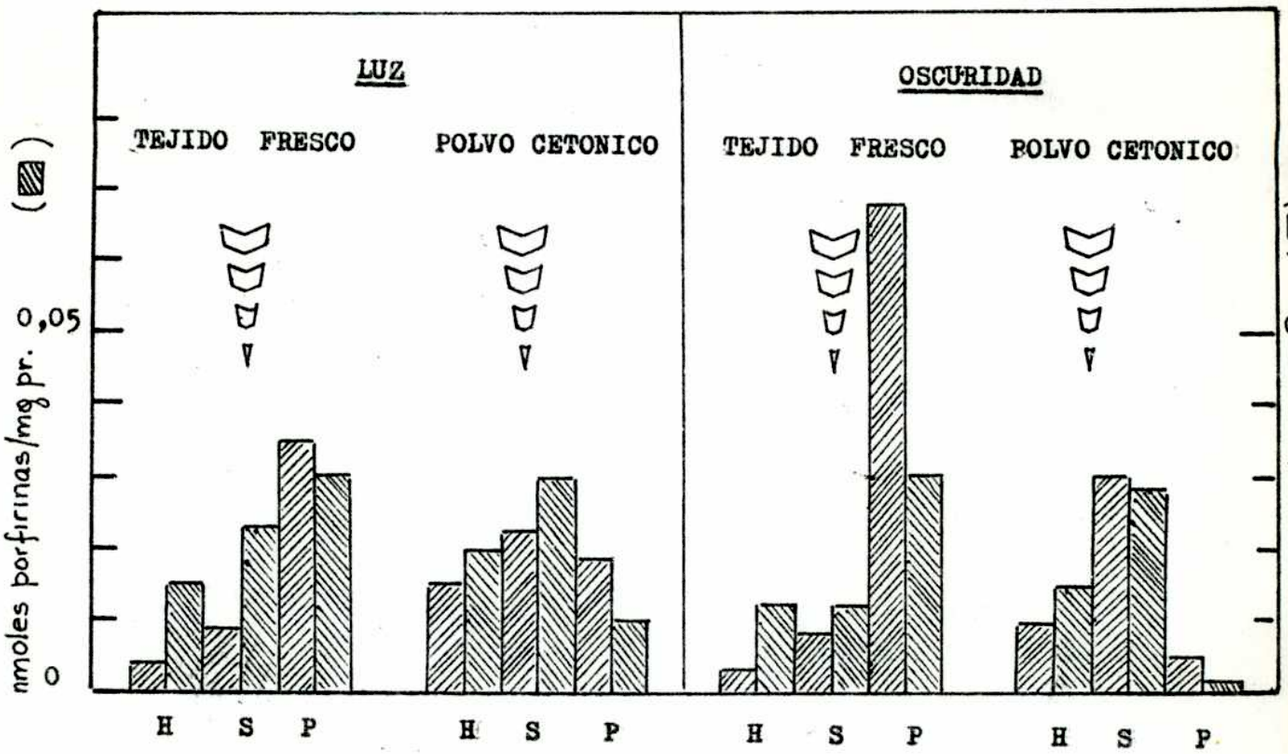


Figura 77: Actividades enzimáticas en fracciones obtenidas de células frescas de Euglena y sus correspondientes polvos cetónicos crecidas en la luz y oscuridad. Las condiciones experimentales son las standard.

Tabla XIV: Relación de actividades para cada fracción por separado según las condiciones de iluminación durante el crecimiento de las células.

Fuente	expresión de la actividad	Fracciones		
		Homogenato	Sobrenadante	Pellet
TF	p	$H_l \cong H_o$	$S_l \cong S_o$	$P_l \ll P_o$
	s	$H_l \cong H_o$	$S_l \gg S_o$	$P_l \cong P_o$
PC	p	$H_l > H_o$	$S_l \cong S_o$	$P_l \gg P_o$
	s	$H_l > H_o$	$S_l \cong S_o$	$P_l \gg P_o$

Símbolos : TF = tejido fresco ; PC = polvo cetónico ; l = luz o = oscuridad ; p = actividad expresada como nmoles de porfirinas/ mg de proteína y s = actividad expresada como µg sustrato consumido/ mg de proteína.

Tabla XV: Relación entre las actividades de H, S y P entre sí según las condiciones de iluminación

Condiciones de iluminación	Tejido fresco	Polvo cetónico
Luz	$H_p < S_p \ll P_p$ $H_s < S_s \ll P_p$	$P_p = H_p \ll S_p$ $P_s . < H_s \ll S_s$
Oscuridad	$H_p < S_p \ll P_p$ $S_s < H_s \ll P_s$	$P_p \ll H_p \ll S_p$ $P_s \ll H_s \ll P_s$

Las abreviaturas p, s tienen el mismo significado que el aclarado en la Tabla XIV.

Tabla XVI : Relación entre las actividades de una misma fracción proveniente de células frescas o sus polvos cetónicos.

Condiciones de iluminación	Expresión de la actividad	Fracciones		
		Homogenato	Sobrenadante	Pellet
L	p	$H_{TF} < H_{PC}$	$S_{TF} << S_{PC}$	$P_{TF} >> P_{PC}$
	s	$H_{TF} \cong H_{PC}$	$S_{TF} < S_{PC}$	$P_{TF} >> P_{PC}$
O	p	$H_{TF} << H_{PC}$	$S_{TF} < S_{PC}$	$P_{TF} >> P_{PC}$
	s	$H_{TF} \cong H_{PC}$	$S_{TF} << S_{PC}$	$P_{TF} >> P_{PC}$

Se usan las mismas abreviaturas de la Tabla XIV .

la actividad del pellet también es mucho menor que la del H y ésta como antes menor que la de S. Es decir, en el caso de los polvos cetónicos la mayor actividad se detecta en S.

Si por otro lado consideramos en valores absolutos esa distribución diferente de las actividades en las tres fracciones de tejido fresco o polvo cetónico, se aprecia que las actividades de los H y S de tejido fresco son siempre menores que las de los correspondientes H y S de polvo cetónico, y como vemos la actividad del P de tejido fresco es mucho mayor que la del P de polvo cetónico.

Resumiendo, las condiciones de iluminación como ya habíamos visto, no parecen influir significativamente en la actividad. Sin embargo, la distribución de la enzima es diferente según provenga de tejido fresco o polvo cetónico; en tejido fresco la mayor actividad de PBGasa está en pellet. En cambio en polvo cetónico ha pasado preferentemente al sobrenadante pero al mismo tiempo acompañada de Decarboxilasas. De manera que para nuestros propósitos, cuando estemos interesados en una fuente rica o única de PBGasa nos seguirá conveniendo usar pellet de tejido fresco.

Sobre estas mismas fracciones H, S y P de tejido fresco y polvo cetónico se determinaron los contenidos proteico y de clorofila, cuyos resultados se ilustran en la Figura 78. En cuanto al primero se observa que en tejido fresco, tanto en H como en S el contenido de proteínas es mayor en oscuridad que en luz, en cambio para pellet se invierte, lo cual concuerda con las observaciones de Brawerman y colaboradores (1959, 1962). En cambio en polvo cetónico hay mayor proteínas en H y P de células crecidas en la luz. En resumen cualquiera sea la fuente, tejido fresco o polvo cetónico y las condiciones de iluminación la relación del contenido proteico entre las distintas fracciones es H>S>P, y además los valores de polvo cetónico son inferiores a los de tejido fresco.

Respecto al contenido de clorofila, como ya vimos va a ser menor en oscuridad que en luz para el tejido fresco y en polvo cetónico siempre vamos a tener menos clorofila que en las células de las cuales provienen. Observemos que en polvo cetónico y en oscuridad no se detectó pigmento en ninguna fracción. Nuevamente se reitera la ventaja de la utilización de células crecidas en la oscuridad o eventualmente de sus polvos cetónicos, precisamente por el bajo o nulo contenido de clorofila.

Agreguemos que también se llevaron a cabo una serie de experiencias empleando polvo cetónico y tejido fresco de Euglena crecida en la luz y en la oscuridad para investigar el efecto de la atmósfera de incubación, aeróbica o anaeróbica, los resultados obtenidos cayeron en general dentro del patrón recién discutido.

Asímismo, en caso de que eventualmente se emplearan polvos cetónicos como fuente de partida para la obtención de las enzimas, se estudió su estabilidad llevándose a cabo determinaciones de la actividad a distintos tiempos,

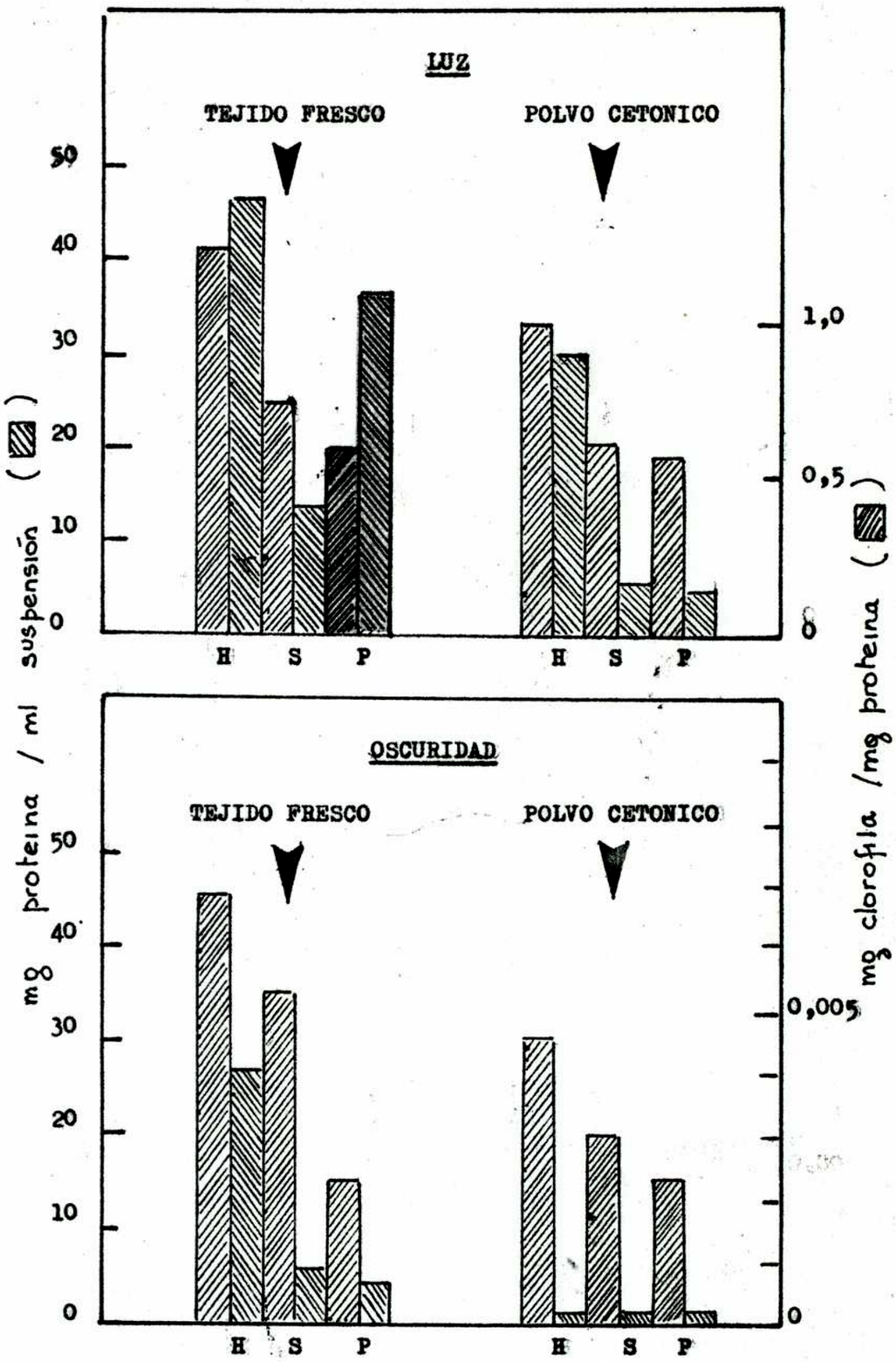


Figura 78: Contenido proteico y de clorofila en las fracciones obtenidas de células frescas y sus correspondientes polvos cetónicos crecidas en la luz y en la oscuridad.

manteniendo el polvo cetónico en un desecador al vacío. De un análisis de los resultados (Figura 79) obtenidos, vemos que no hay inactivación, por el contrario luego de dos meses los valores de actividad son aún superiores a los de los preparados originales, un fenómeno al cual no se le puede dar una explicación lógica por el momento.

Por otro lado se realizaron experiencias con el objeto de determinar si una vez cosechada la Euglena, se podía guardar en heladera por lo menos 24 horas, para luego emplearla en la preparación de las fracciones usuales. De un análisis de los datos obtenidos para pellet por ejemplo, (Tabla XVII), obtenido inmediatamente después de la cosecha y al día siguiente, se observa que la actividad se mantiene perfectamente, tanto en incubaciones aeróbicas como en anaeróbicas, de modo que es posible cosechar el día anterior a la realización de la experiencia.

I.- 15.- DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE LA REACCION:

En la mayoría de las fuentes el pH óptimo de esta reacción se encuentra en la zona neutra. Empleando Euglena cosechada a los cuatro días, crecida en la oscuridad o en la luz, se prepararon suspensiones en distintos buffers 0,05M a varios pH para obtener el homogenato luego por sonicación.

De acuerdo con experiencias previas, tanto con callos de soya como con la misma Euglena, se sabía que las suspensiones de estas células modifican el pH original del buffer empleado, el cual puede alterarse aún más después de la ruptura de las mismas por sonicación. De manera que resultó de interés determinar el pH de la suspensión antes y después del tratamiento con ultrasonido. En la Tabla XVIII se muestran los valores promedios de cuatro experiencias realizadas con Euglena crecida en oscuridad; datos similares se obtuvieron con células verdes. Observamos que, con excepción del buffer de pH6, Euglena, al igual que ocurría con callos de soya aunque en menor grado que ésto, podríamos decir que son células "neutro-ácidas" pues producen por simple suspensión en el buffer un descenso de su pH; esta variación es más pronunciada en el caso de los buffer de glicina y menos en fosfato y menor aún en Tris. Luego de la sonicación el pH disminuye todavía más, en una forma paralela a la recién analizada para la suspensión. Este nuevo decremento estaría indicando que después de la disgregación de las células se liberan compuestos o constituyentes intracelulares que acidifican aún más el homogenato resultante.

Con las distintas fracciones resultantes H, S y P, se llevaron a cabo luego las mediciones de actividad enzimática para la determinación del pH óptimo. Indudablemente los pH promedio de los homogenatos fueron los ya vistos en la Tabla XVIII. Se observó que coincidían con los de los sobrenadantes correspondientes obtenidos por centrifugación. En cambio, los pellet hubo que resuspenderlos nuevamente en buffer para efectuar las incubaciones y tanto en este caso como en los anteriores, resultó de interés determinar el pH antes y después de la incubación. Como para el pellet se encontraron también variaciones entre los valores del pH original del buffer, los iniciales y finales, vamos a ilustrar

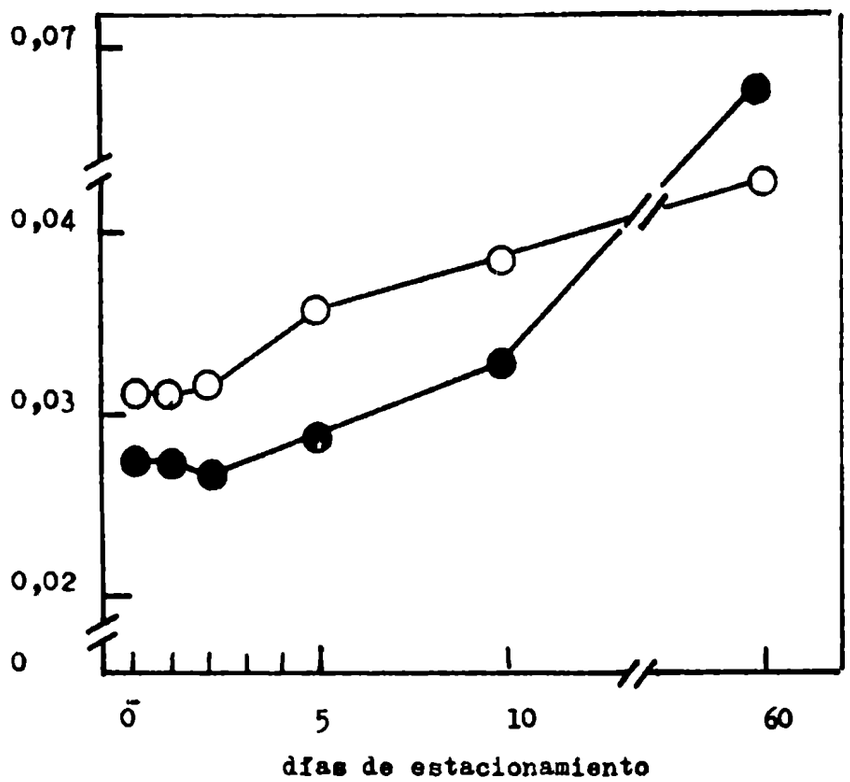


Figura 79: Variación de la actividad enzimática con el tiempo de estacionamiento, en sobrenadante de polvos cetónicos de Euglena, crecidos en la luz (o) y en la oscuridad (•).

Tabla XVII : Estudio comparativo de la actividad enzimática en pellet de células cosechadas el mismo día y 24 horas antes.

Sistema enzimático	Atmósfera de incubación	
	Anaerobiosis	Aerobiosis
Pellet 0 hrs	1,112	1,1371
Pellet 24 hrs	0,994	1,1555

Las condiciones experimentales son las standard.

Se empleó *Euglena* crecida en oscuridad. La actividad está expresada en nmoles porfirinas /mg proteína.

Tabla XIII : Determinación de los pH de suspensiones de células de Euglena antes y después de su sonicación.

pH buffer empleado	pH antes sonicación	Δ pH suspensión	pH después sonicación	Δ pH sonicación	$\overline{pH}$
6	6,33	+0,33	6,20	+0,13	6,27
7	6,94	-0,06	6,87	-0,07	6,91
7,4	7,30	-0,10	7,20	-0,10	7,25
8_F	7,55	-0,45	7,31	-0,24	7,43
8_T	7,75	-0,25	7,58	-0,17	7,67
9_T	8,98	-0,02	8,53	-0,45	8,76
9_G	7,63	-1,37	6,75	-0,88	7,19
10	8,23	-1,77	7,32	-0,90	7,76
11	8,90	-2,10	8,20	-0,70	8,55

Los datos tabulados son promedios de cuatro experiencias, empleando Euglena crecida en la oscuridad.

F: buffer fosfatos; T: buffer Tris-HCl; G: buffer glicina-OHNa

entonces los datos obtenidos con esa fracción (Tabla XIX). Aparentemente, pues ello depende también de la capacidad buffer de la mezcla empleada, el pellet de por sí sería un preparado "neutro-alcalino" produciéndose en general variaciones menores luego de su suspensión. Por otro lado, es interesante el análisis de lo que sucede al final de la incubación, en todos los casos el pH desciende después de las cuatro horas de la incubación en anaerobiosis; también es curioso que esa disminución (ΔpH) (Figura 80) es mínima al pH 7,4, que veremos es el óptimo, y muestra su variación máxima entre los pH 8 y 9, que también corresponden a un segundo pico de pH óptimo cuando la actividad se expresa en función del sustrato consumido. Todavía no podemos ofrecer una buena explicación a este fenómeno, quizás sea una coincidencia accidental, sin embargo sospechamos que no es así y debemos ahondar más en el problema.

Utilizando como valores de pH los datos promedios del pH inicial y final de la Tabla XIX se graficaron las curvas de actividad en función del pH. En la Figura 81, se puede observar que cuando la actividad se mide en base a las porfirinas formadas, el pH óptimo aparente se encuentra definidamente a pH 4, descendiendo bruscamente hacia valores más ácidos. En cambio si tomamos los datos obtenidos en función del PBG consumido, aparece nuevamente un pico definido en la misma zona neutra, aunque a pH 6,9 - 7,0; pero además un segundo lomo más ancho entre los pH 8 y 9; luego desciende también rápidamente arriba de pH 9,0. Recordemos que un comportamiento idéntico a éste, habían mostrado las enzimas de callos de soya. Aparentemente, la reacción que llevaría directamente a la formación de porfirinas tendría un único pH óptimo; sin embargo el consumo de PBG, parecería ocurrir en dos etapas o a través de dos reacciones que tendrían una expresión máxima de actividad a dos pH diferentes. Ya señalamos que varias evidencias experimentales indican la existencia de dos etapas en la polimerización del PBG en Uroporfirinógenos; sin embargo, es todavía difícil conciliar estos resultados. No podemos aquí pensar que ese segundo pH se deba a un consumo de PBG por otra enzima, como la pirrol oxigenasa, pues las incubaciones son anaeróbicas, lo cual descarta completamente esa posibilidad, debiendo aceptarse la alternativa primera, de que estamos frente a dos reacciones que emplean como sustrato al PBG en forma diferencial.

De todas maneras, se continuó empleando buffer fosfato y pH 7,4 como el óptimo para las determinaciones de actividad enzimática.

I.- 16.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DEL SUSTRATO. CINETICA DE LA REACCION.

Hasta el momento se habían venido empleando una concentración aproximadamente 40 μM de PBG en nuestras mezclas de incubación. Se procedió entonces a determinar la curva de saturación de sustrato. Se llevaron a cabo repetidas experiencias, empleando como sistema enzimático la fracción pellet de Euglena crecida en oscuridad 4 días, manteniendo también todas las demás condiciones standard excepto que se emplearon cantidades variables de PBG desde 10 a 120 μM. Deseamos notar que se escogió intencionalmente el pellet para llevar a cabo estos ensayos por cuanto es la fracción en la cual estamos midiendo solamente actividad de PBGasa. Recordemos que no se detectan Decarboxilasas activas en la misma.

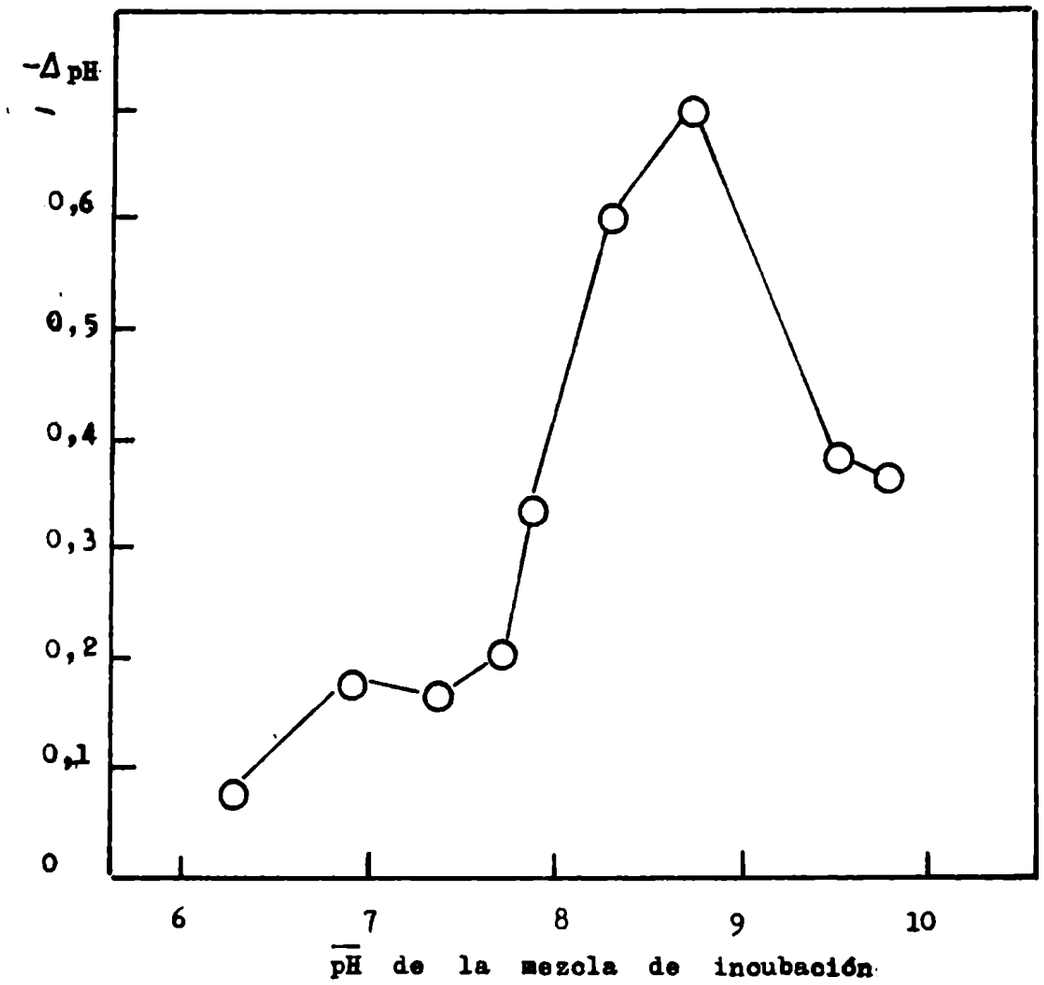


Figura 80: Descenso del pH de la reacción enzimática durante la incubación. Los datos corresponden a pellet y provienen de las columnas -Δ pH de incubación y $\overline{pH}$ de la Tabla XIX.

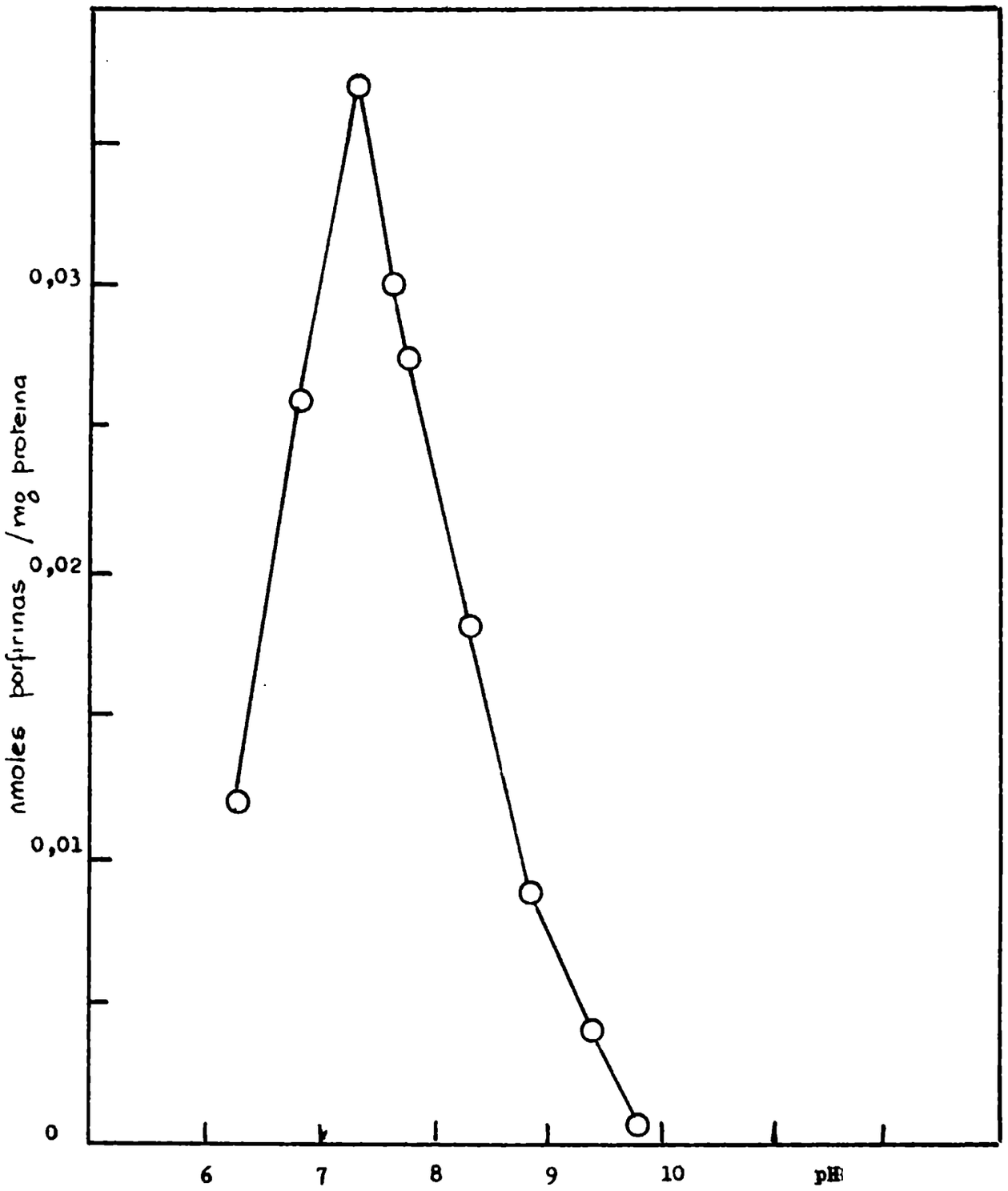


Figura 81: Determinación del pH óptimo de la reacción. La actividad está expresada en función de las porfirinas formadas. Los datos son promedios de 4 experiencias, obtenidos con la fracción pellet.

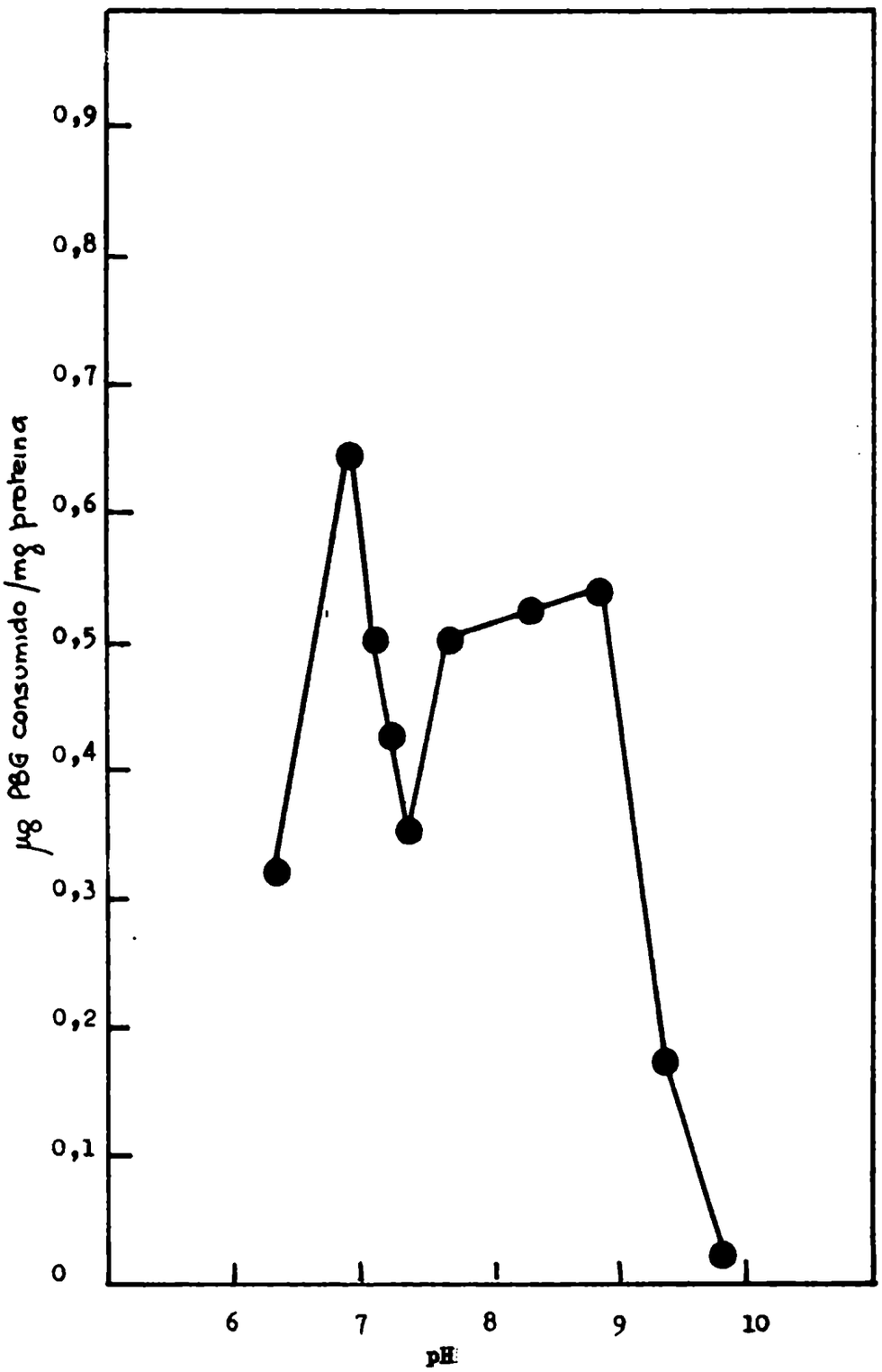


Figura 82: Determinación del pH óptimo de la reacción. La actividad está expresada en función del PBG consumido. Las condiciones son las mismas que las indicadas en la Figura 81.

Tabla XIX : Medición del pH inicial y pH final de las mezclas de incubación.

pH original buffer	pH_i	Δ pH suspensión	pH_f	Δ pH incubación	$\overline{pH}$
6	6,38	+0,38	6,30	-0,08	6,34
7	7,07	+0,07	6,89	-0,18	6,98
7,4	7,46	+0,06	7,30	-0,16	7,38
8_F	7,80	-0,20	7,60	-0,20	7,70
8_T	8,60	+0,60	8,09	-0,59	8,35
9_T	9,25	+0,25	8,56	-0,69	8,91
9_G	7,9	-1,10	7,60	-0,30	7,75
10	9,66	-0,34	9,29	-0,42	9,45
11	10,03	-0,97	9,57	-0,46	9,80

Los datos tabulados son promedios de cuatro experiencias y corresponden a la fracción pellet obtenida de Euglena crecida en oscuridad. F: fosfato; T: tris; G: glicina; pH_i: pH inicial de la incubación, inmediatamente luego de la suspensión del pellet en el buffer de un dado valor de pH original; pH_f: pH al final de cuatro horas de incubación.

En la Figura 83 se muestran los valores promedios de tres experiencias representándose directamente las velocidades totales de formación de porfirinas o consumo de PBG en función de la concentración de sustrato. Vemos que los perfiles son similares si graficamos actividades específicas (Figura 84). Aparentemente si nos referimos a la velocidad de la reacción en función de las porfirinas formadas, esta parecería responder a una cinética michaeliana, contrariamente a lo encontrado para la misma enzima de otras fuentes (Sancovich et al, 1969b; Llambías y Batlle, 1970b,c; Llambías et al; 1971). Sin embargo, si ahora observamos los valores obtenidos cuando medimos la velocidad en función del consumo de PBG, la gráfica sería de tipo sigmoideo y además, a las concentraciones máximas de sustrato usdas, tampoco habíamos llegado a la saturación, pero por los datos que enseguida analizaremos no estábamos muy lejos del plateau.

Este comportamiento diferencial se vé confirmado cuando hacemos los gráficos de las dobles recíprocas (Figura 85). De aquí también encontramos que, a pesar de que el comportamiento cinético es diferente según midamos producto formado o sustrato consumido, el Km calculado de ambas curvas es totalmente coincidente y está en el orden de 10^{-5}M, como se vé en la Tabla XX; la velocidad máxima de formación de porfirinas y la de consumo de PBG son inferiores a las encontradas en otros tejidos; como mencionamos antes al referirnos a la curva de saturación de sustrato (Figuras 83 y 84), si bien no se había llegado a la meseta, a los 120 µM de PBG, se estaba próxima a ella y efectivamente en una experiencia posterior empleando solamente 60, 90, 120, 150 y 180 µM de sustrato se comprobó que a los 150 µM se alcanzaba la saturación. De la misma Tabla XX, observamos que el n de Hill para la reacción de consumo de PBG tiende a 2, apoyando la idea de que en este proceso ocurren fenómenos de interacción homotrópica positiva, entre por lo menos dos sitios de unión distintos para el PBG. Estos resultados son quizás, un poco inesperados pero notemos una vez más que estamos frente no solo a un sistema enzimático complejo sino también a un organismo cuyo comportamiento es sumamente peculiar y con frecuencia caprichoso.

Otros datos llamativos, que también fueron observados con las enzimas de callos de soya, son la falta de estequiometría en la reacción de conversión de 4 moles de PBG en uno de Uroporfirinógeno (Tabla XXI); sin embargo es curioso que en este caso a valores de PBG de 10 µM se cumpliría la relación teórica, luego a medida que aumentamos la concentración del sustrato hasta que se alcanza la velocidad máxima de formación de producto esa relación se incrementa, pero también es muy interesante que, dicho exceso en el consumo real de PBG parece responder a una constante (entre 30 y tal vez 90 µM), es decir es siempre 4 veces más que el teórico; una vez llegado al máximo (90 µM) la relación sube rápida y linealmente (como ocurría entre 10 y 30 µM) hasta 10, a 150 µM, que es cuando se llega a los dos niveles de saturación (Figura 86).

El solo hecho de que prácticamente en todo momento se observe un exceso de consumo de sustrato, con respecto a la cantidad de Uroporfirinas que aparecen, nos está sugiriendo la muy probable formación de intermediarios poli-

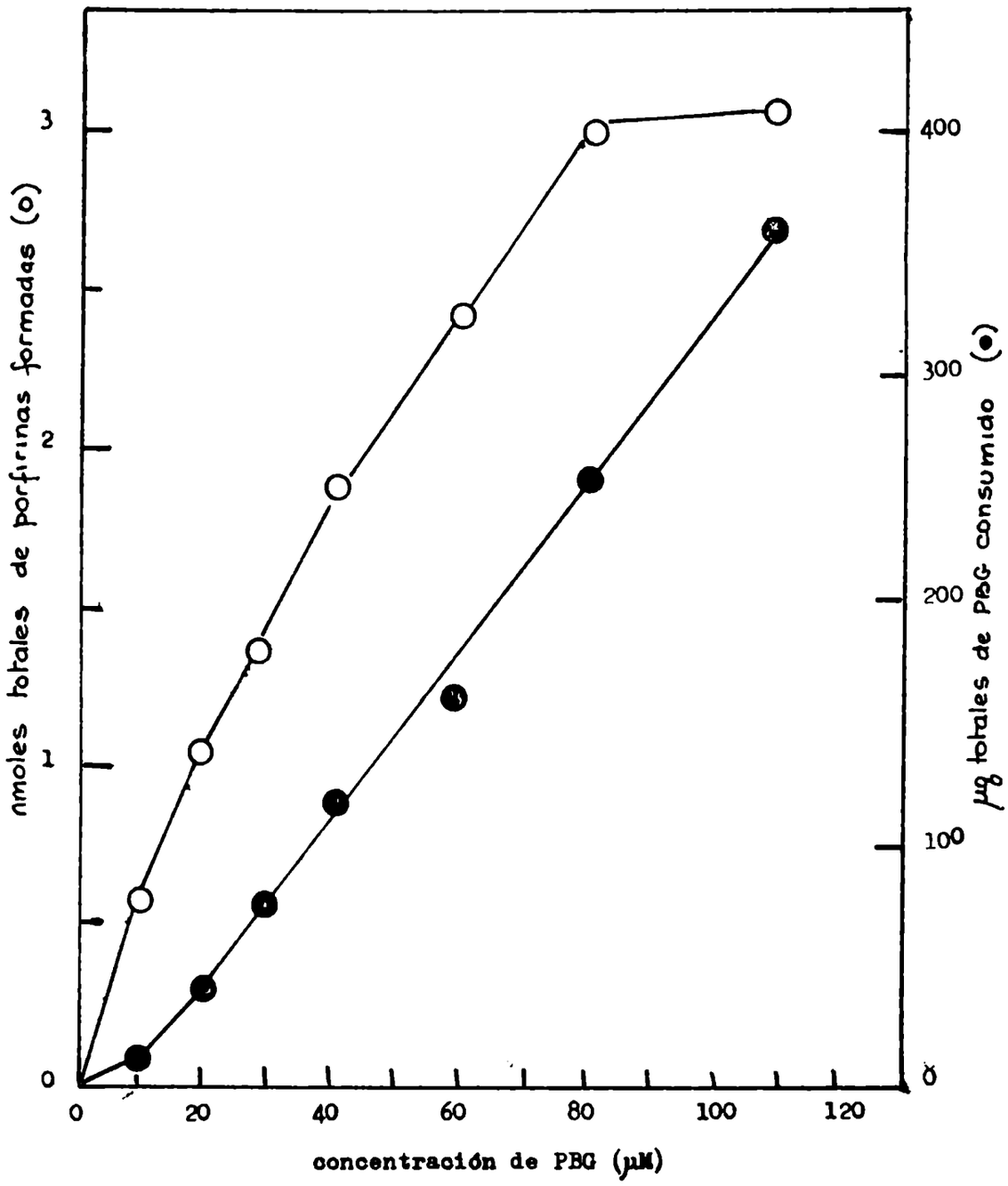


Figura 83: Curva de saturación de sustrato. Se expresan las cantidades totales de porfirinas formadas (o) o de PBG consumido (•) en función de la concentración de PBG agregado a la mezcla de reacción

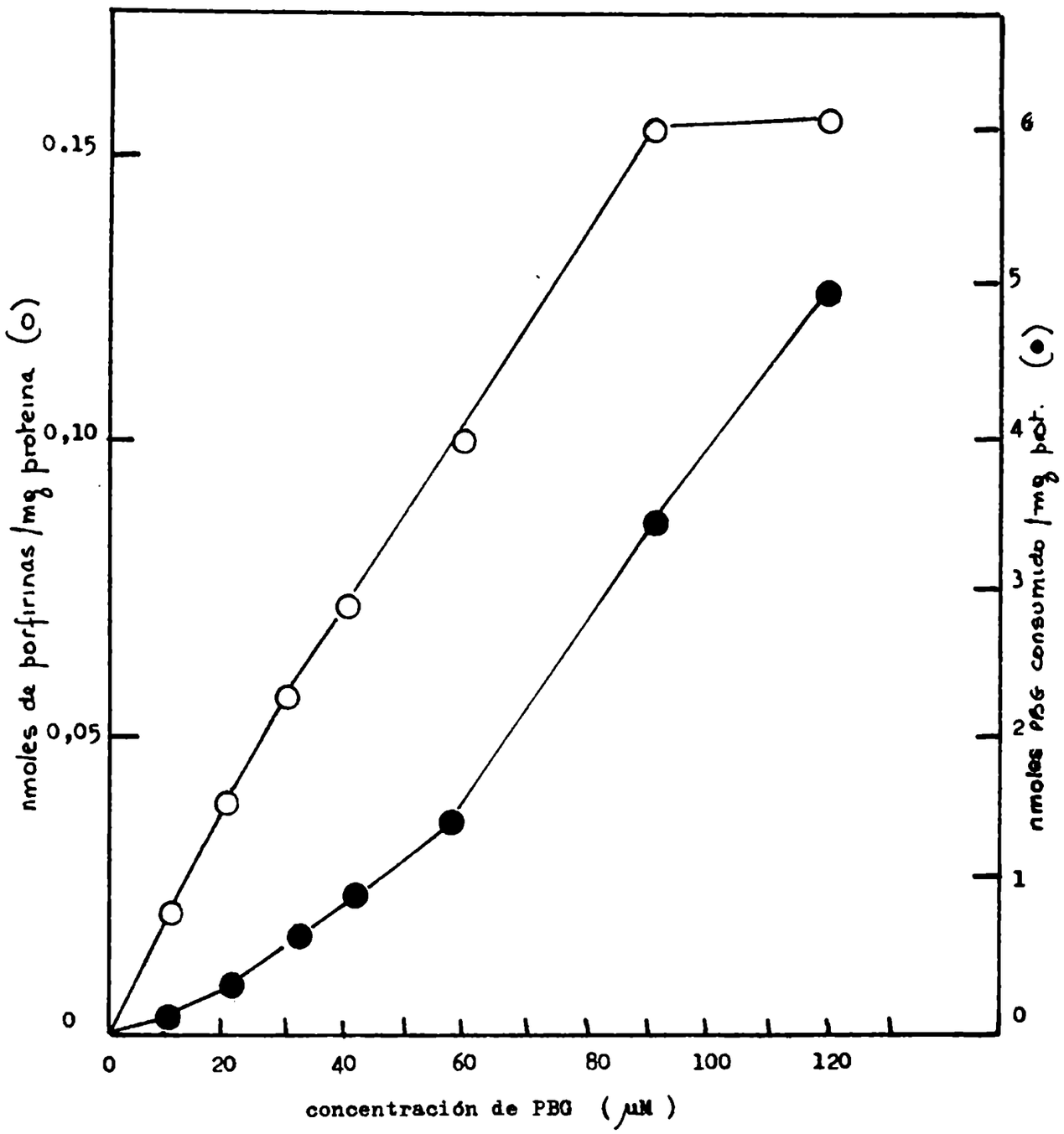


Figura 84: Relación entre la actividad específica y la concentración de PBG.

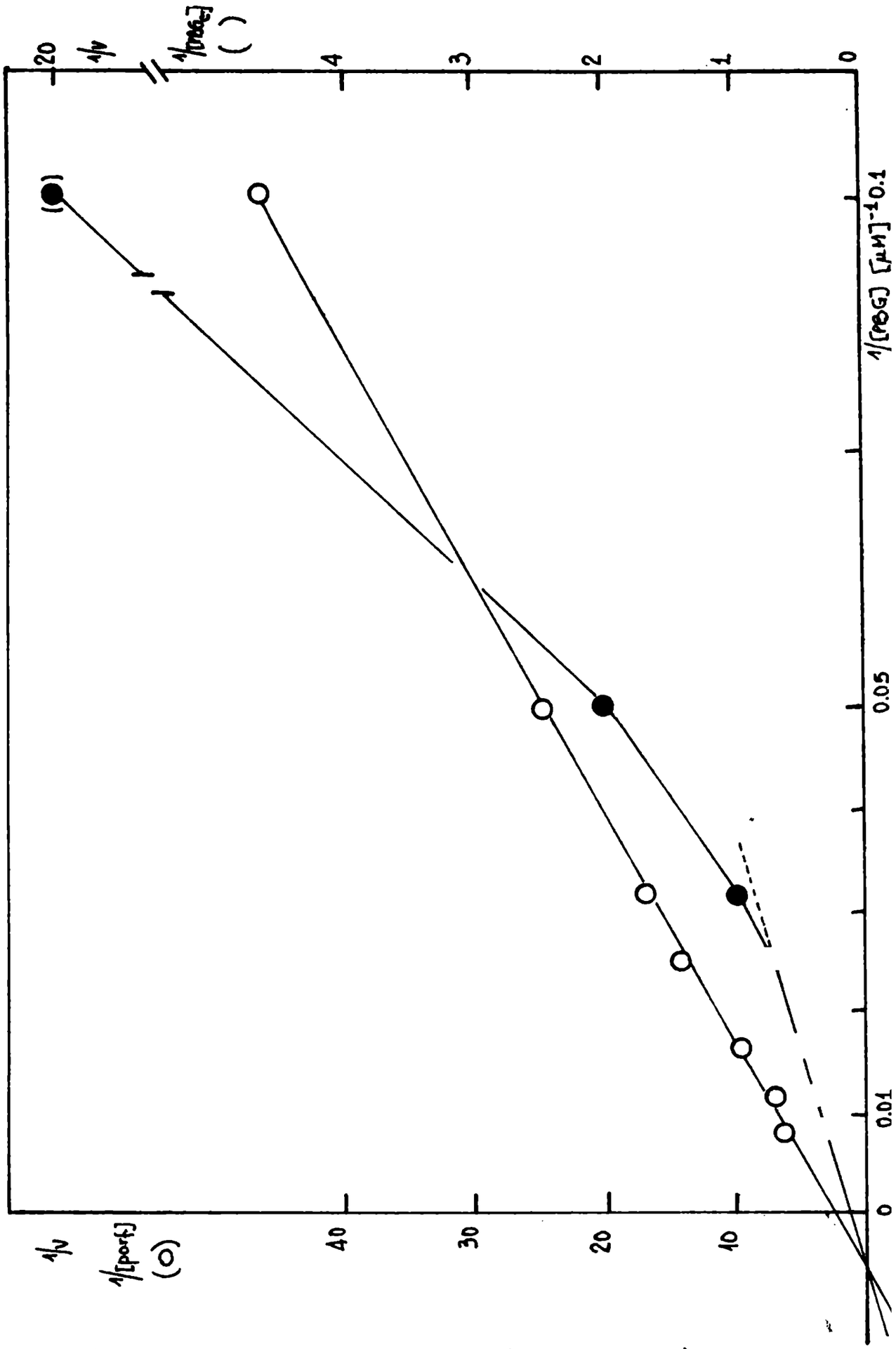


Figura 85: Gráfico de las dobles recíprocas (Lineweaver-Burk), de la velocidad de formación de porfirinógenos (o) y de consumo de PBG (●), con respecto a la concentración de sustrato, catalizada por la enzima de pellet de *Euglena*.

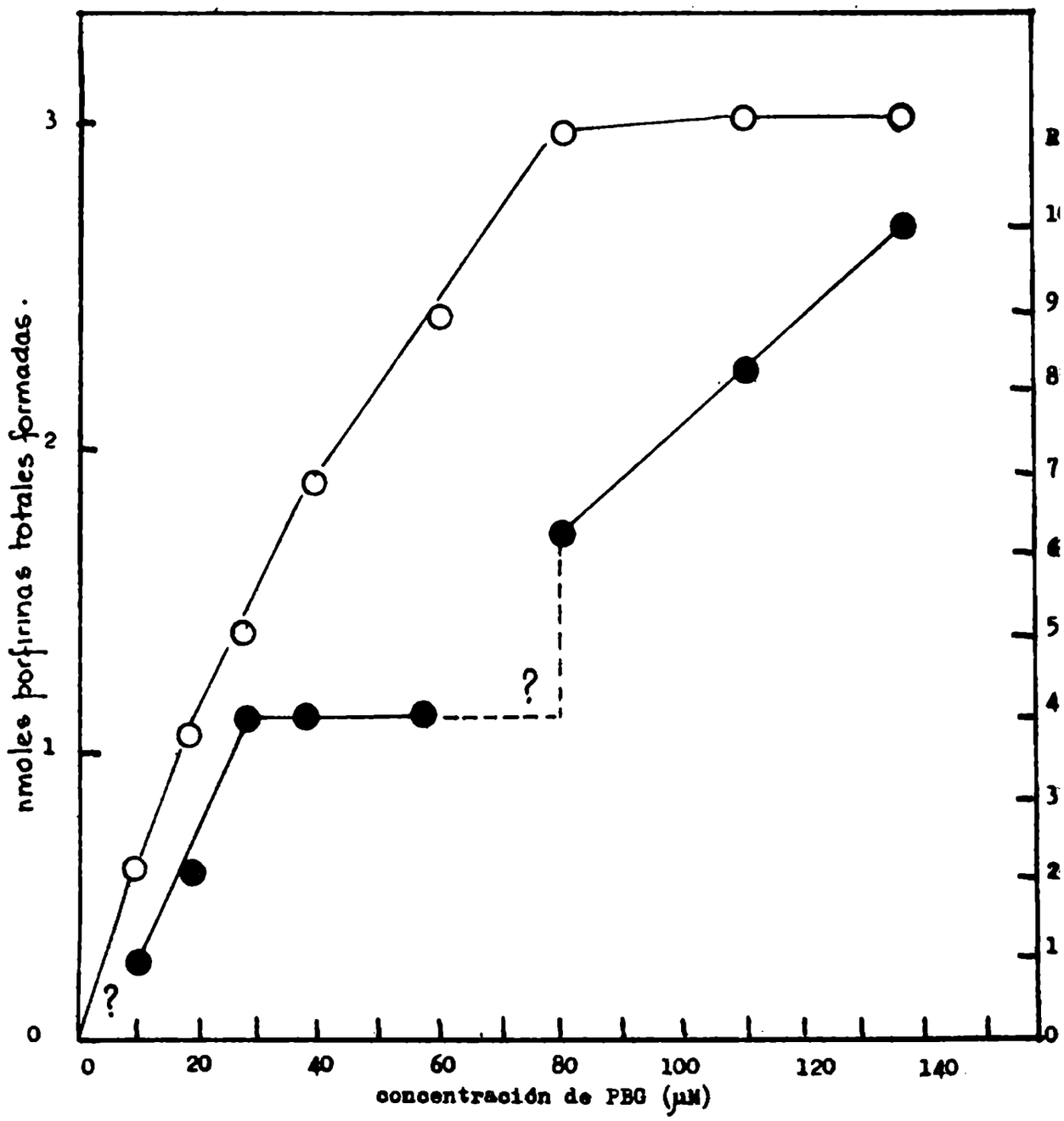


Figura 86: Relación entre la cantidad real de PBG consumido y la estequiométricamente teórica . R = consumo real/consumo teórico

Tabla XX : Parámetros cinéticos de la enzima de Euglena

Parámetros cinéticos	Expresión de la velocidad	
	Formación de uroporfirinas	Consumo de PBG
Km aparente (M)	$1,33 \times 10^{-5}$	$1,33 \times 10^{-5}$
Vmax (nmoles/mg / hora)	0,153	6,304
n de Hill (*)	1	1,7

Los datos tabulados fueron calculados de los valores representados en las Figuras [illegible] y [illegible]

Los coeficientes de Hill (n) se calcularon de las pendientes de los gráficos de $\log(V/Vmax - V)$ en función del $\log[PBG]$.

Tabla XXI : Correlación entre la cantidad de producto formado y de sustrato consumido a distintas concentraciones de PBG.

Concentración de PBG empleada (µM)	Producto formado	PBG consumido		
		nmoles/mg proteína		
	nmoles porfirinas / mg proteína	real	teórico	real / teórico
10	0,021	0,048	0,044	1,09
20	0,038	0,448	0,152	2,95
30	0,056	0,896	0,224	4,00
40	0,071	1,176	0,284	4,11
60	0,100	1,604	0,400	4,01
90	0,160	4,000	0,640	6,20
120	0,153	5,123	0,612	8,30
150	0,155	6,210	0,620	10,0

pirrólicos en la polimerización enzimática del PBG, que además deberían encontrase presentes a lo largo de toda la reacción.

I.- 17.- INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE PROTEINA ENZIMATICA:

Con el objeto de optimizar aún más las condiciones para la determinación de la actividad enzimática, empleando nuevamente pellet, se realizaron varias experiencias tendientes a estudiar el efecto del empleo de cantidades variables de proteína sobre la formación de porfirinas y consumo de PBG usando una concentración de PBG de 40 µM. Los datos obtenidos se ilustran en las Figuras 87 y 88. En la Figura 87 observamos que los nmoles de porfirinas totales formadas aumentan linealmente con cantidades de proteínas crecientes, sin embargo, con el PBG consumido no sucede lo mismo, alcanza un máximo bastante rápidamente y luego no se consume más sustrato, si bien todavía quedaría cerca de un 50% del agregado, recordemos que estas enzimas, consumen un exceso de por lo menos 4 veces y hasta 10, del estequiométricamente necesario; entonces podría suceder que ya con 30 µg de proteína se hubiera utilizado el máximo de la cantidad de PBG disponible agregado, para la formación por ejemplo de los intermediarios polipirrólicos, de manera que aunque se aumente más la proteina enzimática, ésta solo podría utilizar esos intermediarios preformados para sintetizar más porfirinas pero no consumiría más PBG pues ya no habría quedado pirrol remanente "útil". Esta teoría aunque bastante especulativa, también sugeriría que uno o más componentes del sistema enzimático serían responsables de ese consumo del PBG y formación de los intermediarios y que aparentemente habría otro componente o tal vez una parte del mismo complejo, que solamente actuaría utilizando esos intermediarios y produciendo finalmente las porfirinas. Este es un problema muy difícil de dilucidar todavía; pero indudablemente, si el agregado de más enzima no revela consumo adicional de PBG y en cambio hay formación proporcional de producto necesariamente estamos proveyendo más cantidad de ese componente capaz de utilizar como sustrato a ese intermediario, unido probablemente a la proteina enzimática, ciclándolo y liberándolo al medio bajo la forma de Uroporfirinas. Notemos que de acuerdo con esta teoría, también estaríamos presuponiendo que ese intermediario sintetizado en condiciones extremas, es decir cuando ya se consumió todo el PBG útil, tendría que tener una estructura del tipo tetrapirrilmetano.

En la Figura 88 representamos los efectos del empleo de cantidades crecientes de enzima, sobre las actividades específicas; estas nuevas relaciones no hacen más que apoyar lo propuesto anteriormente al analizar la Figura 87; vemos allí que la actividad específica en función de las porfirinas formadas se mantiene constante, en cambio cuando se la expresa en función del PBG consumido decrece hasta un valor determinado y luego no se altera por mayor adición de proteína.

I.- 18.- EFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION:

En base a experiencias previas,hasta este momento se había adoptado

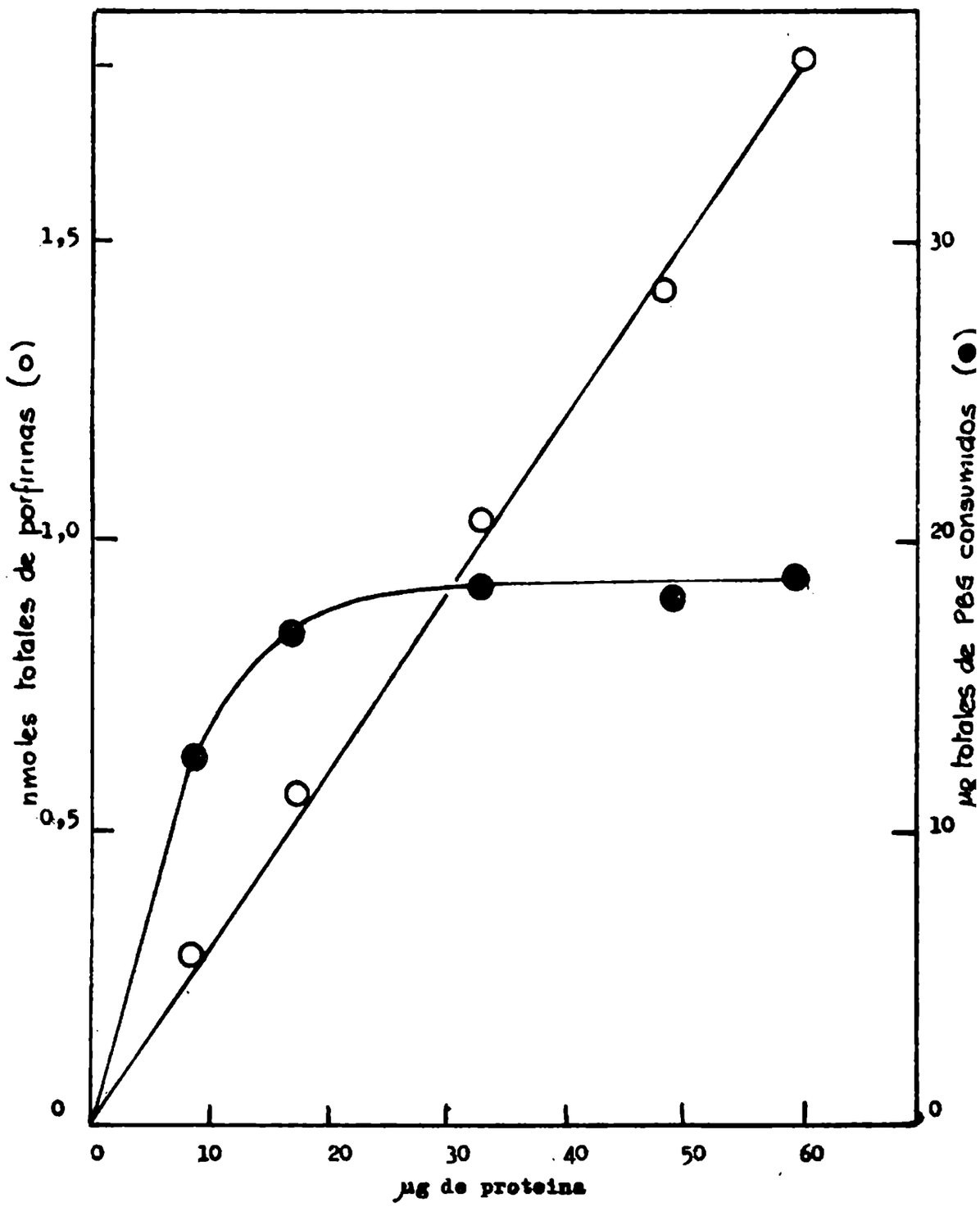


Figura 87: Efecto de la cantidad de proteina enzimática sobre la formación total de porfirinas y consumo de PBG. Se usó la fracción pellet y el reso de las condiciones fueron las standard.

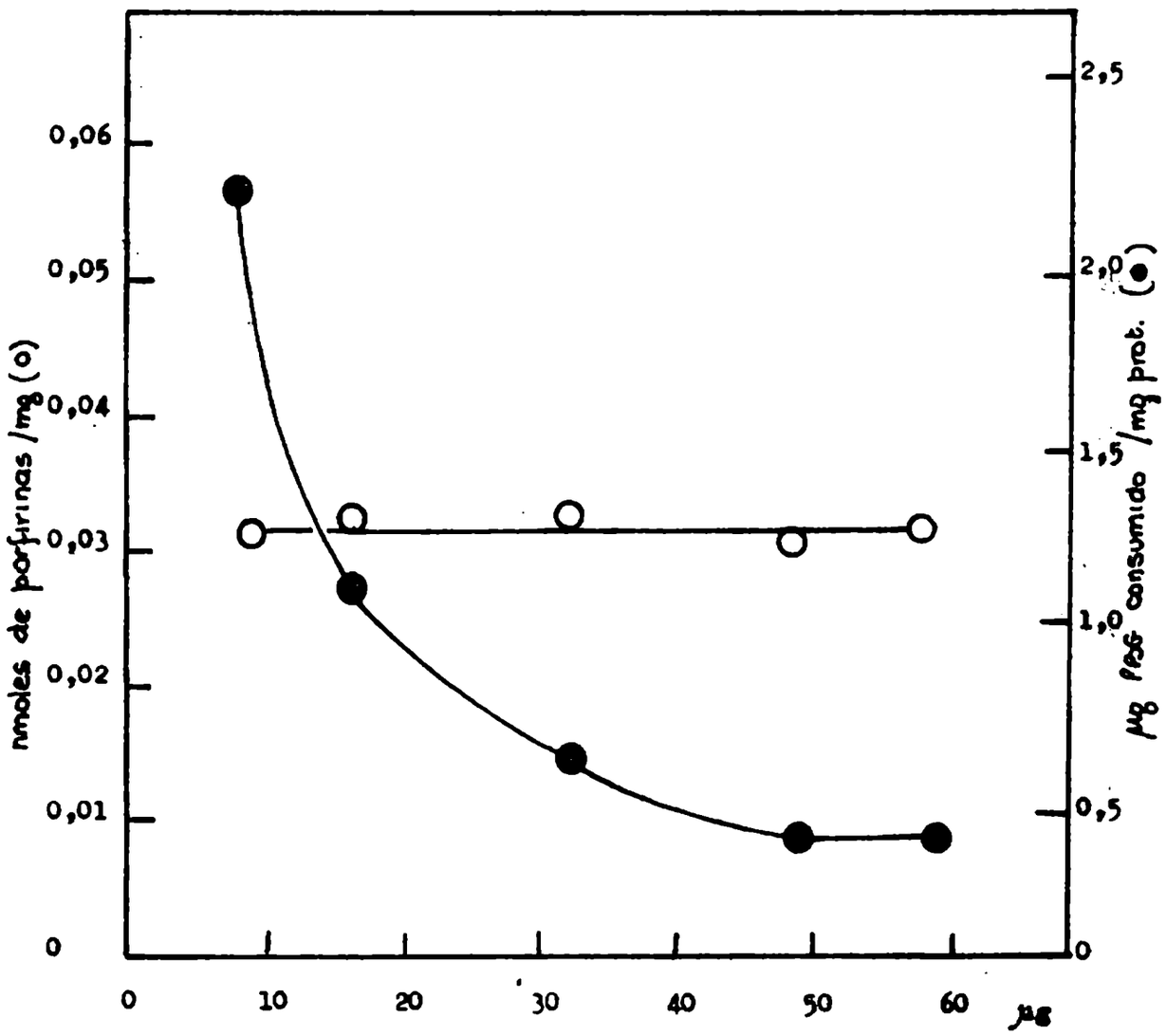


Figura 88: Efecto de la cantidad de proteina enzimática sobre la actividad especifica, expresada en funcida de la formación de porfirinas (o) e del consumo de PBG (e). El resto de las condiciones son las mismas que las indicadas en la Figura 87.

como tiempo de incubación standard el de 4 horas; era necesario entonces estudiar en detalle los efectos del tiempo de incubación, como siempre, sobre las porfirinas formadas y el PBG consumido. También nos interesaba determinar cuál era la influencia de la atmósfera a lo largo del tiempo. Si recordamos que en Euglena, la reacción de formación de porfirinas es preferente o necesariamente anaeróbica según la fracción que empleemos, pero que con pellet rico en PBGasa, encontrábamos igual comportamiento en anaerobiosis o en aerobiosis; ello justifica que hayamos decidido utilizar esta última fracción para llevar a cabo un grupo de experiencias en las cuales se mantuvieron todas las demás condiciones standard, modificándose únicamente el tiempo de incubación e incubando paralelamente en atmósferas anaeróbica y aeróbica.

En las Figuras 89 y 90 sólo se ilustran los resultados de esta primera serie de ensayos acerca de la influencia del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática. Podemos ver aquí que el tipo de curvas obtenido es bastante similar en ambas atmósferas; es decir, aparentemente, el aire no modificaría demasiado la reacción, si bien la síntesis de porfirinas es menor a mayores tiempos de aerobiosis. Pero hay varios puntos llamativos, si bien no demasiado pronunciados durante los primeros 60 minutos parecería haber un lag en la formación del producto, que luego aumentaría a mayor velocidad casi linealmente en atmósfera anaeróbica y siguiendo una ancha hipérbola en aerobiosis. Por otro lado, en cuanto al consumo de PBG, aparentemente a los 30 minutos habría una utilización de cerca del 80-90% del sustrato, pero alrededor de la hora se libera gran parte a la solución para luego seguir una curva de consumición más o menos normal excepto que después de las 5 horas volvería a liberarse PBG al medio. No es fácil explicar estos fenómenos , sólo recordemos por ahora que también fueron observados con las enzimas de callos de soya. Además como ya lo discutimos, el rendimiento de porfirinas en base a la cantidad de PBG consumido es muy bajo, estando en el orden de 4 veces menos que la relación estequiométrica teórica de 1 a 4.

Teniendo en cuenta entonces estos hallazgos, sumados a su analogía con experiencias similares realizadosen callos de soya y a pesar de que en este caso no habíamos observado un lag tan pronunciado en la síntesis de porfirinas, surgió inmediatamente una vez más, que en estas preparaciones de Euglena gracilis se estaban formando intermediarios polipirrólicos entre el PBG y los Uroporfirinógenos, pero a diferencia de las enzimas de callos, sospechábamos que podrían estar presentes a lo largo de toda la reacción y que sus estructuras no serían las mismas. Como anticipamos, el estudio de la formación, aislamiento, identificación y papel de estos intermediarios constituye uno de los aspectos fundamentales de esta Tesis, por lo cual nos ocuparemos de ellos en extenso en un capítulo aparte.

Solamente agregaremos, que para las incubaciones standard, se siguió empleando el tiempo de 4 horas, como hasta este momento.

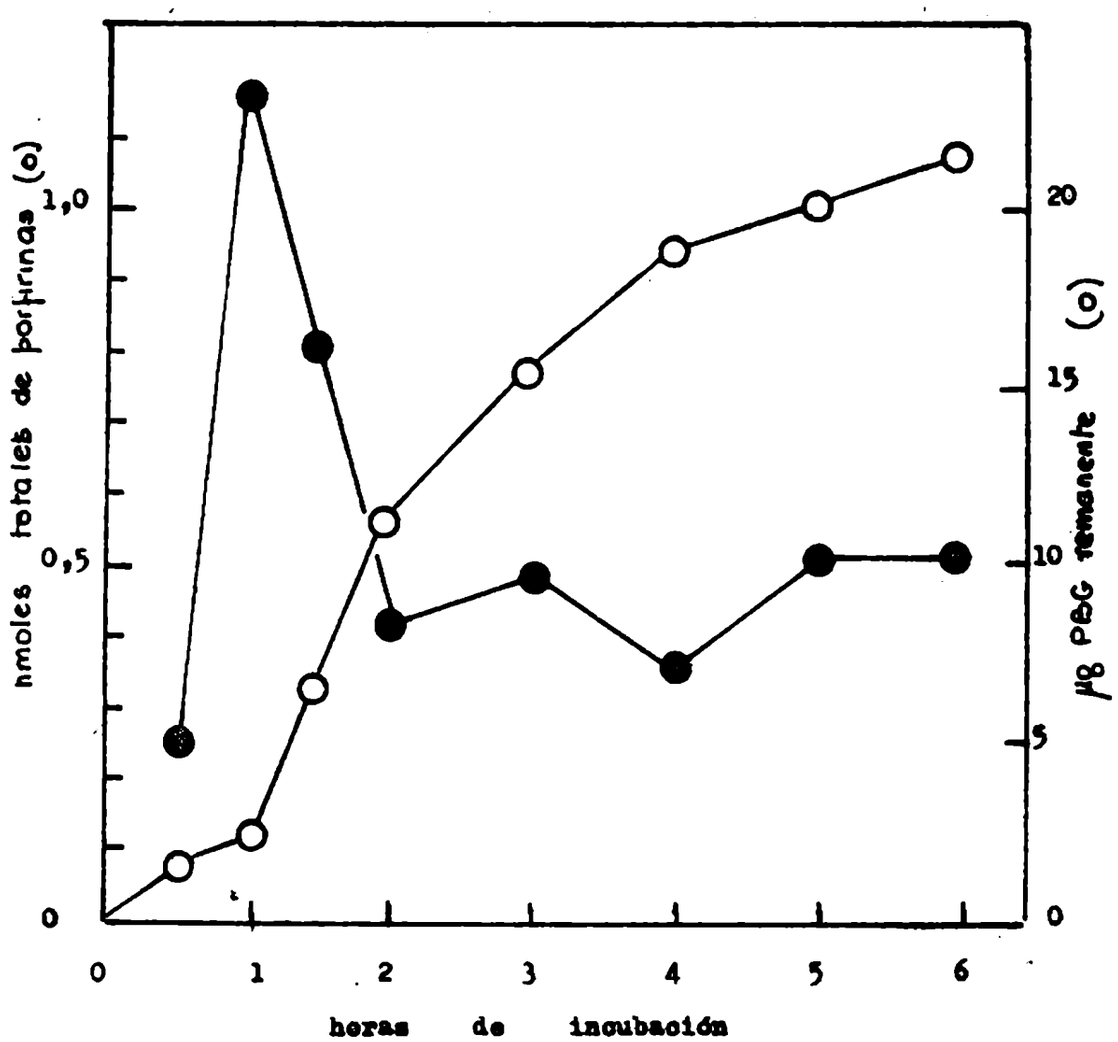


Figura 89: Efecto del tiempo de incubación sobre la formación de porfirinas y consumo de PBG por la fracción pellet, en atmósfera aeróbica. Las demás condiciones son las standard

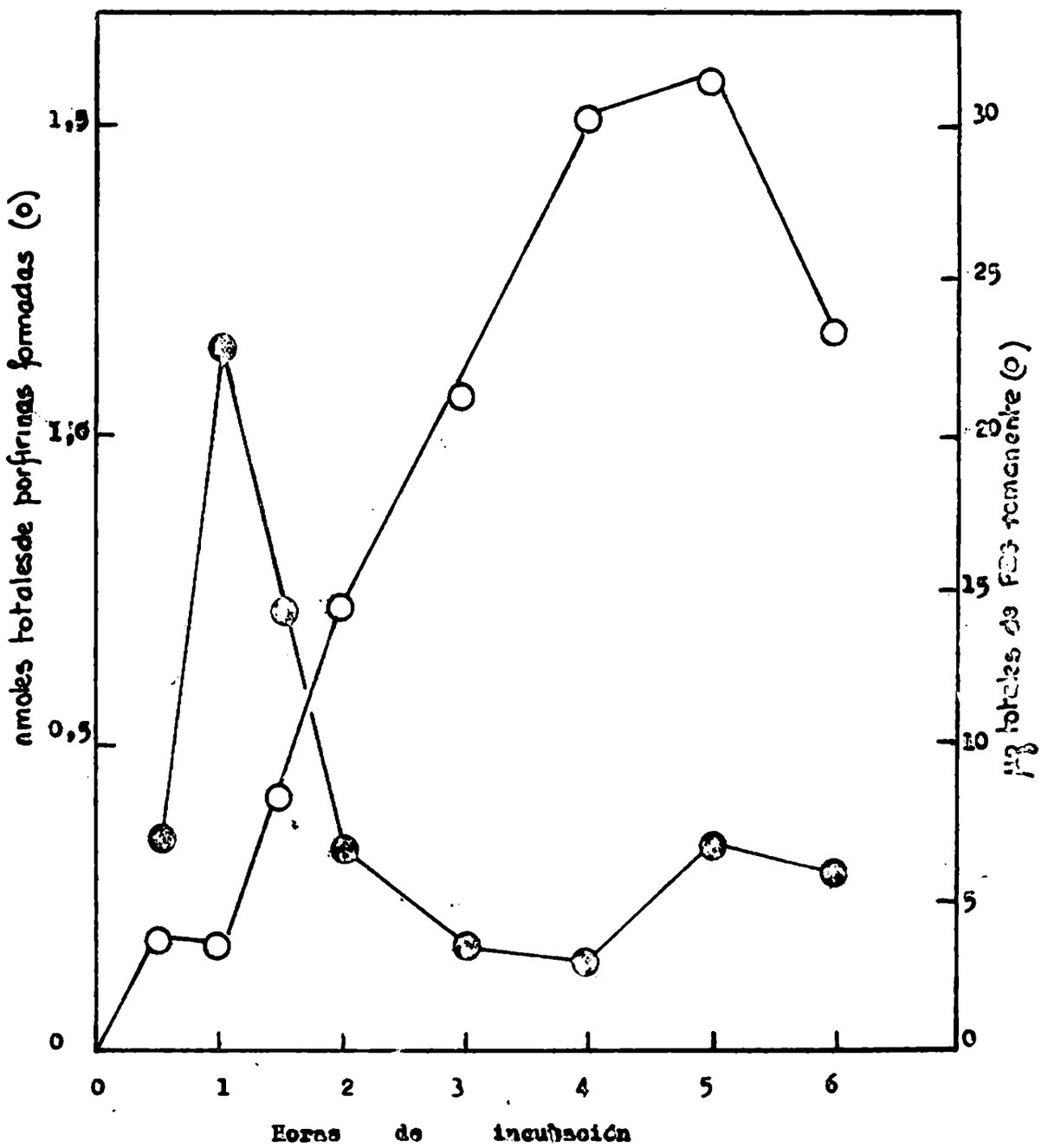


Figura 90: Efecto del tiempo de incubación sobre la formación de porfirinas (o) y el consumo de PBG (o), por la fracción pellet, en atmósfera anaeróbica. Las demás condiciones son las standard.

"El estudio de los mecanismos enzimáticos, objeto de innumerables investigaciones en los últimos años, es un problema difícil. Las dificultades provienen en gran parte de la imposibilidad de aislar las enzimas al estado puro y poder conocer su estructura mejor. Esto es particularmente aplicable a las enzimas de la biosíntesis de las porfirinas, que en muchos casos sólo se han conseguido purificar parcialmente".

Alfred Gajdos & Marianne Gajdos-Torok (Húngaros), en "Porphyrines et Porphyries Biochimie et Clinique" (1969) Masson & Cie.-Eds.-Paris.

II.- ENSAYOS DE PURIFICACION DE LAS ENZIMAS.

II.- 1.- CONSIDERACIONES GENERALES:

En esta parte, nos vamos a referir a los distintos ensayos que se llevaron a cabo para intentar purificar la PBGasa de Euglena, separar y purificar asimismo sus componentes Deaminasa e Isomerasa, así como determinar los pesos moleculares de las fracciones más puras.

Estos objetivos constituyeron en realidad pronto un desafío a nuestra constancia, imaginación y paciencia.

Uno de los mayores inconvenientes con el uso de organismos fotosintéticos es la presencia de clorofila, pues este pigmento generalmente resulta una molesta interferencia en los procesos de purificación; es por ello que en estos casos se suelen emplear las células etioladas o bien los polvos cetónicos provenientes de estas mismas o aún de células verdes cuyo contenido en pigmentos ya vimos es muy bajo o casi nulo.

En primer lugar debimos decidir entonces cuál sería el material de partida para el aislamiento y purificación de nuestras enzimas. Recordemos que si bien los polvos cetónicos podrían ser una buena fuente, al obtener mediante los procedimientos standarizados las fracciones homogenato, sobrenadante y pellet la mayor parte de la actividad enzimática conteniendo PBGasa pero también rica en Decarboxilasas, pasaba al sobrenadante; en cambio partiendo de células frescas teníamos la posibilidad de obtener un sobrenadante con las mismas enzimas y un pellet, aun más activo que este sobrenadante y además desprovisto de actividad de carboxilante. En consecuencia, se decidió usar células frescas. Observamos asímismo que era indistinto emplear Euglena crecida en luz u oscuridad para la mayoría de los fines; de manera que obviamente, optamos por emplear en estas experiencias Euglena crecida en la oscuridad, cosechada a los 4 días, como material de partida.

No contábamos con suficientes evidencias experimentales como para asegurar que la PBGasa presente en el sobrenadante fuera la misma enzima que la asociada a pellet, de manera que naturalmente se planeó purificar la PBGasa a partir de ambas fracciones, adoptándose criterios análogos para los casos de la Deaminasa e Isomerasa.

Para las determinaciones de los pesos moleculares, las distintas preparaciones se corrieron en columnas de Sephadex G-100 o Sepharosa 4B, previamente calibradas con proteínas de pesos moleculares conocidos como se describe en Métodos. En algunos casos se efectuaron electroforesis en geles de poliacrilamida, también calibrados según se detalla en Métodos, de manera que sólo nos limitaremos a reportar los datos encontrados, cuando no se aclare nada serán valores obtenidos por el método de filtración por geles y en caso de haberse usado el de electroforesis se indicará al pie de las Tablas.

Se ilustrarán perfiles de elución cromotográfica típicos para cada preparación, graficándose únicamente los datos de contenido proteico y nmoles de porfirinas formadas, hacemos notar solo aquí, que se obtuvieron curvas similares o coincidentes representando cantidad de PBG consumido o las correspondientes actividades específicas; pero su inclusión en las mismas u otras figuras no aportarían nada nuevo por lo cual se decidió simplificar los grafismos.

II.- 2.- AISLAMIENTO, PURIFICACION Y PESOS MOLECULARES DE LA PBGasa DE SOBRENADANTE:

Luego de varios ensayos preliminares, la secuencia de pasos finalmente empleada fué la que se muestra en la Tabla XXII y que describimos a continuación:

Etapa 1: Homogenato: Se preparó el homogenato según la técnica habitual.

Etapa 2: Sobrenadante: Por centrifugación a 24.000 x g durante 30 minutos se obtuvo un precipitado o pellet (P) y el correspondiente sobrenadante (S).

Etapa 3: Fracción 30-80% de Sulfato de amonio: El sobrenadante de la etapa anterior se empleó entonces como fuente de la enzima, para ello se lo llevó a 30% de saturación con sulfato de amonio, luego de 40 minutos de agitación, se centrifugó 10 minutos a 11.000 x g. Se descartó el precipitado y el nuevo sobrenadante se llevó a 80% de saturación con sulfato de amonio, se dejó agitando una hora, luego de lo cual se centrifugó como antes, colectándose ahora la fracción 30-80%. El precipitado proteico se desaló por pasaje a través de Sephadex G-25 grueso, tanto para la medición de la actividad como para un tratamiento posterior con gel de fosfatos.

Etapa 4: Sobrenadante de gel de fosfatos: El eluído de G-25 se trató con una suspensión de gel de fosfatos (en la relación 2 mg gel/mg proteina), con agitación continua durante 10 minutos. La mezcla se centrifugó 10 minutos a 11.000 x g y el pellet resultante se lavó 3 veces con 1/5 de su volumen de buffer fosfato 0,05M pH 7,4 conteniendo ClK 0,05M. Los lavados se reúnen finalmente con el sobrenadante primero y la proteina se concentra por precipitación con sulfato de amonio al 80%.

Etapa 5A: Cromatografía en Sephadex G-100: El precipitado salino proteico, suspendido en un pequeño volumen de buffer fosfato, se siembra en una columna calibrada de Sephadex G-100. En la Figura 31 se muestra un perfil de elución característico. Aparece una banda de actividad bien definida, (III), que sale después del pico principal de proteinas y dos lomos pequeños I y II. Sin embargo, la banda III cuyo peso molecular correspondería a un valor de 50.000 dalton o 70.000, según la técnica empleada, todavía estaba acompañada de Decarboxilasas,

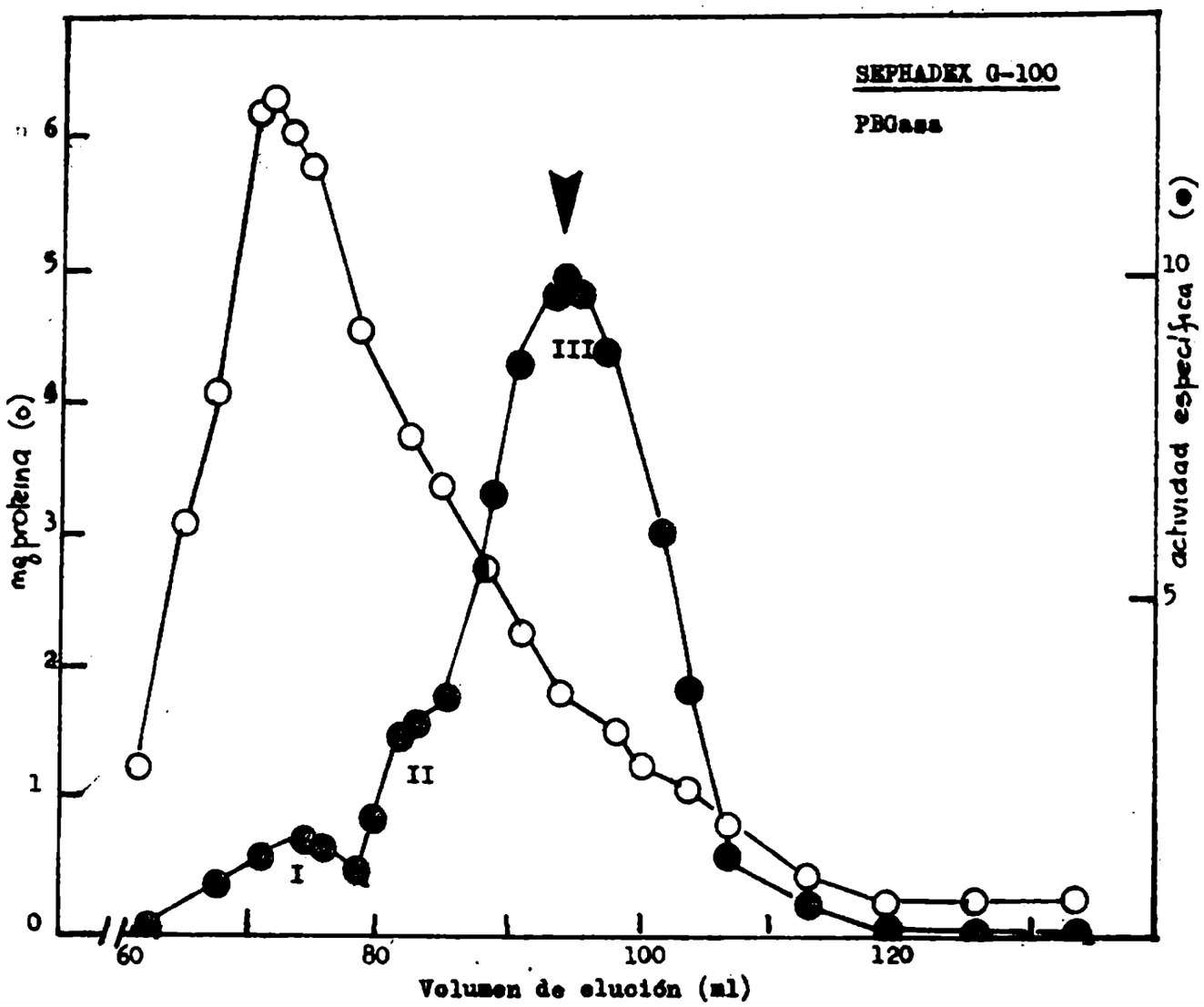


Figura 91: Cromatografía de la fracción sobrenadante de gel de fosfato, correspondiente a la etapa 5 (Tabla XXII) de la purificación de PBGasa de Sobrenadante, a través de una columna de Sephadex G-100 calibrada; equilibrada y eluida con buffer fosfato 0,05M pH 7,4. En cada eluato se determinó contenido proteico (o) y actividad enzimática (●).

Tabla XXII : Cuadro de purificación de la PBGasa de Sobrenadante

Etapa	Δ nmoles porfirinas	mg prot / ml	actividad específica	Proteínas totales (mg)	Unidades totales	Grado de purificación	Porfirinas formadas		Peso molecular
							%URO III	%Decarboxil	
1.Homogenato	0,3571	93,15	0,00383	4191,75	16,07	1	—	100	—
2.Sobrenadante	1,5363	51,75	0,02969	1888,87	56,07	7,7	—	100	—
Pellet	1,5148	35,65	0,04249	1550,77	65,89	—	100	—	—
3.30-80% sulfato de amonio	6,3021	21,27	0,2963	616,95	182,76	77,4	70	30	—
4.Sobrenadante gel de fosfato	5,967	4,60	1,2971	149,90	193,93	338,7	70	30	—
Lavado de gel de fosfato	2,225	6,468	0,3440	42,04	14,46	—	100	—	—
5A.Sephadex G 100 Banda III	8,5398	3,134	2,7249	10,38	28,28	711,5	80	20	50.000*
5B.Sepharosa 4B Banda I	1,730	0,980	1,7640	2,80	4,93	460	45	55	360.000
Banda II	1,630	0,757	2,1531	3,20	6,88	562	40	60	180.000
Banda III	4,371	1,728	2,5293	8,74	22,10	660	10	90	90.000
Banda IV	3,242	1,552	2,0883	8,05	16,81	545	72	28	70.000**
Banda V	2,818	0,781	3,6059	5,89	21,23	703	80	20	54.000

* Por electroforesis en poliacrilamida reveló banda única de peso molecular 70.000

** Por electroforesis en poliacrilamida se separó en dos bandas, de pesos moleculares 70.000 y 125.000

en una asociación tal que no se logró separar ni por recromatografía ni por electroforesis.

Etapa 5B:Cromatografía en Sepharosa 4B: Alternativamente el precipitado proveniente de la etapa anterior, se corrió en una columna de Sepharosa 4B. En la Figura 9: se ilustran los resultados obtenidos. aquí el perfil es más completo, aparecen 5 bandas, 3 de ellas (III, IV y V) más activas que las dos primeras I y II; sin embargo, solo la IV y la V estaban más enriquecidas en PBGasa, si bien todavía acompañadas de Decarboxilasas, con unos pesos moleculares de 70.000 y 54.000 respectivamente. La IV, por electroforesis se resolvió en dos proteinas de 70.000 y 125.000 de peso molecular. La banda III parecería contener la mayor proporción de Decarboxilasas. También se aprecia que habría una gran tendencia a formar especies de pesos moleculares mayores.

Igualmente con estas fracciones, todos los intentos de separar la porción contaminante de Decarboxilasa no tuvieron éxito y aparentemente formarían una asociación molecular casi indivisible. Notemos aquí que en Euglena se han encontrado varios ejemplos de agregados múltiples de enzimas vinculadas a un mismo camino biosíntetico, que no se han podido separar unas de otras (Lara y Mills, 1972; Hankins y Mills, 1976, 1977) no sería difícil entonces que nos encontráramos frente a otro caso similar.

De todas maneras, consederamos que el grado de purificaciónfinal es aceptable, si bien es evidente que el sobrenadante no es la mejor fuente para preparar PBGasa pura, o por lo menos libre de otras actividades.

II.- 3.- AISLAMIENTO,PURIFICACION Y PESOS MOLECULARES DE LA PBGasa DE PELLET:

II.- 3.- 1.- Acerca del uso de agentes caotrópicos para el estudio de proteínas de membrana:

Recordemos una vez más que la fracción Pellet obtenida de células frescas, era una fuente potencialmente interesante para la purificación de la PBGasa por cuanto no revelaba poseer actividad de Decarboxilasas, sin embargo, debíamos resolver primero la forma de extraer la enzima de las partículas.

En general, se sabe mucho menos acerca de las proteínas particuladas o de membrana en comparación con las proteínas citoplásmaticas o solubles. En las membranas, las proteínas pueden encontrarse insertas en ellas, o atravesarlas de un lado a otro y por lo común se encuentran muchas proteínas diferentes en la misma membrana. Análogamente a lo que sucede con las proteinas acuo-solubles, las proteinas de membrana, pueden ser grandes o pequeñas y consistir de una única cadena polipeptídica o ser oligómeros de varias subunidades. Una parte de la superficie de una proteina de partícula siempre es polar y está en contacto con el medio acuoso a cada lado de la membrana, pero también posee siempre una región no polar, que es la que necesita un medio circundante hidrofóbico, siendo ésta la razón de su insolubilidad en agua. De manera, que si nosotros queremos separar

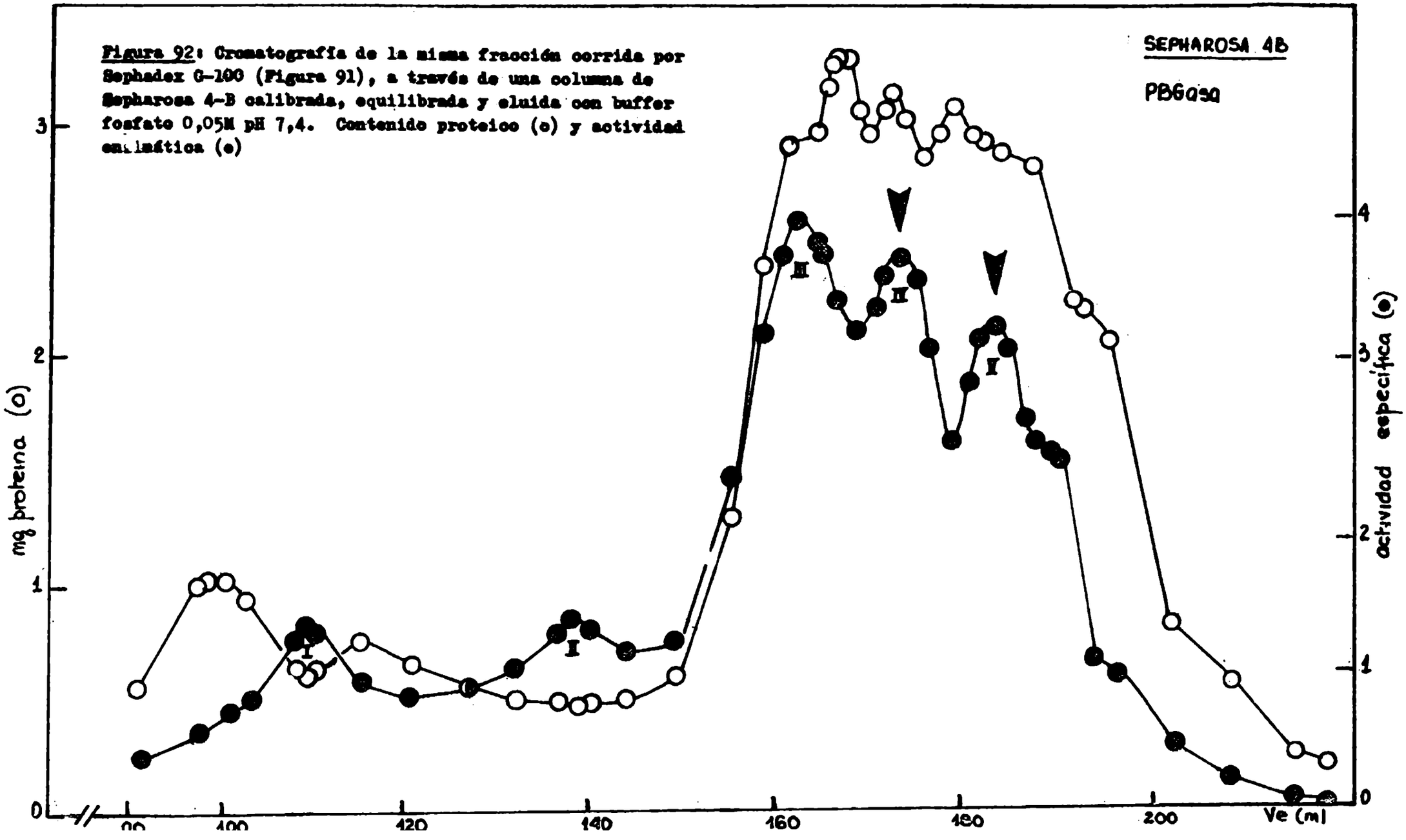


Figura 92: Cromatografía de la misma fracción corrida por Sephadex G-100 (Figura 91), a través de una columna de Sepharosa 4-B calibrada, equilibrada y eluida con buffer fosfato 0,05M pH 7,4. Contenido proteico (o) y actividad enzimática (•)

estas proteinas unas de otras y de la membrana, para estudiarlas debemos necesariamente hallar una forma de solubilizarlas.

Indudablemente el aislamiento de enzimas unidas a membranas implica la separación de la proteina de su ensamblamiento nativo. Para lograr ésto, se usan comunmente métodos que producen una especie de intercambio de los líquidos de la membrana por detergentes iónicos y no iónicos o bien solubilización directa por medio de sales caotrópicas o una combinación de ambas técnicas. Así se han conseguido solubilizar varias enzimas mitocondreales (Davies y Hatifi, 1969, 1971; Hatifi y Hanstein, 1969; Daugh y King, 1972; Dailey y Lascelles, 1974; Pinto y Frisell, 1975).

Acabamos de decir que una proteina unida a una membrana posee muy probablemente residuos hidrofóbicos sobre su superficie, que en su estado nativo deben interactuar con los líquidos de la membrana. Para que la enzima mantenga esta conformación después que se la separa de la partícula, o bien el solvente que interactúe con esa región hidrofóbica de su superficie debe ser no polar, o bien otro compuesto, que posea restos tanto polares como no polares, como los detergentes, debe interponerse entre la zona no polar de la proteina y el solvente. Se ha propuesto que los agentes caotrópicos aumentan la lipofilicidad del agua (Hatifi y Hainstein, 1969) facilitando o permitiendo una interacción directa del solvente con la proteina a diferencia de los detergentes que en realidad se unen a la proteina formando una miscela artificial.

Nos pareció entonces interesante ensayar el uso de agentes caotrópicos como por ejemplo el SCNa para solubilizar la PBGasa de pellet.

II.- 3.- 2.- Esquema de purificación:

Como es usual, luego de algunas experiencias previas, se llegó al esquema de purificación que se muestra en la Tabla XXIII y cuyos pasos fueron los siguientes:

Etapa 1: Homogenato: Obtenido en la forma usual.

Etapa 2: Pellet: Preparado a partir de homogenato, también como de costumbre.

Etapa 3: El pellet se resuspendió en un volumen de una solución 0,5M de SCNa igual al del homogenato original y se sonicó durante 30 segundos en porciones de 6-8 ml. La suspensión resultante se centrifugó luego durante 90 minutos a 105.000 x g. Se obtuvo un sobrenadante que inmediatamente se pasó por una columna de Sephadex G-25 grueso para eliminar todo el sulfocianuro, (se había determinado previamente que el sulfocianuro inhibe significativamente la actividad enzimática).

El nuevo pellet después del tratamiento se lavó una vez con 2-3 veces su volumen de buffer fosfato, se centrifugó 30 minutos a 105.000 x g; el lavado contenía muy poca actividad por lo cual se deshechó, en tanto que el pellet se resuspendió nuevamente en el mismo buffer para controlar su actividad que también resultó despreciable. De manera que no queda actividad remanente en el pellet luego del tratamiento con sulfocianuro de sodio ni tampoco se recupera por lavado, es decir el procedimiento es sumamente eficiente para la extracción de la PBGasa,

que además se purifica 4 veces en esta sola etapa. Por otro lado normalmente no se procede al lavado del pellet tratado.

Etapa 4: Fracción 30-80% de sulfato de amonio: El eluido de la etapa anterior se fraccionó entre 30 y 80% con sulfato de amonio, en la misma forma descripta para la etapa 3 de la purificación de PBGasa de sobrenadante. Como es usual para la medición de la actividad se desaló una parte por Sephadex G-25 grueso.

Etapa 5A: Cromatografía en Sephadex G-100: La fracción 30-80% suspendida en pequeño volumen de buffer se corrió en una columna calibrada de Sephadex G-100. En la Figura 93 se observa el gráfico de elución; la mayor parte de la proteina sale primero asociada a un lomo muy pequeño de actividad, en tanto que la actividad enzimática aparece después, podríamos decir que en una sola banda, sin embargo consistentemente apareció un hombro bien definido sugiriendo la presencia de especies moleculares diferentes, de manera que distinguimos entonces lo que denominamos banda I y lomo II, a los cuales correspondieron valores de pesos moleculares de 50.000 y 25.000 respectivamente, con actividad exclusiva de PBGasa, produciendo 100% de Uroporfirina III. Si comparamos el comportamiento cromatográfico en Sephadex G-100 de esta preparación (Figura 93) com la anterior (Figura 91 desde ya, la PBGasa de sobrenadante viene asociada con Decarboxilasas, pero también había dado una banda, quizás menos definida que esta, de igual peso molecular con un grado de purificación no muy diferente tampoco del obtenido para la banda I de pellet, que parece desdoblarse en un componente de menor peso molecula y además, reiteremos se trata de PBGasa pura.

Etapa 5B: Cromatografía en Sepharosa 4B: La misma fracción 30-80% se cromatograff en Sepharosa 4B; en la Figura 94 apreciamos los correspondientes perfiles proteic y de actividad. En cuanto al primero no difiere mucho del obtenido con la preparación de sobrenadante (Figura 92); en general también vemos que la actividad enzimática cabe dentro del grueso de las proteinas, sin embargo en este caso, aparecen dos bandas bien definidas que señalaremos como I y II cuyos pesos moleculares corresponden a 50.000 y 23.000 dalton, coincidiendo con los obtenidos por Sephadex G-100. Se observan también unos pequeños lomos en la zona de pesos moleculares mayores y la ausencia de las Decarboxilasas. El grado de purificación es mucho menor comprado con Sephadex pero también contamos con una preparación de PBGasa pura, que una vez más, revela cierta tendencia a existir en la forma de dos especies moleculares aquí mejor definidas y como antes, se observa que la actividad específica de la banda principal I duplica la de la segunda banda II o lomo.

Con estos datos no podemos aún establecer si esta preparación pura de PBGasa de pellet es la misma proteina o no que la obtenida parcialmente purificada de sobrenadante, aunque aparentemente parecerían presentar un comportamiento cromatográfico bastante parecido.

También debemos aclarar aquí, que los datos de actividad reportados en la Tabla XXIII fueron obtenidos llevando a cabo las incubaciones en atmósfera anaeróbica, pero es importante que paralelamente se hicieron determinaciones en

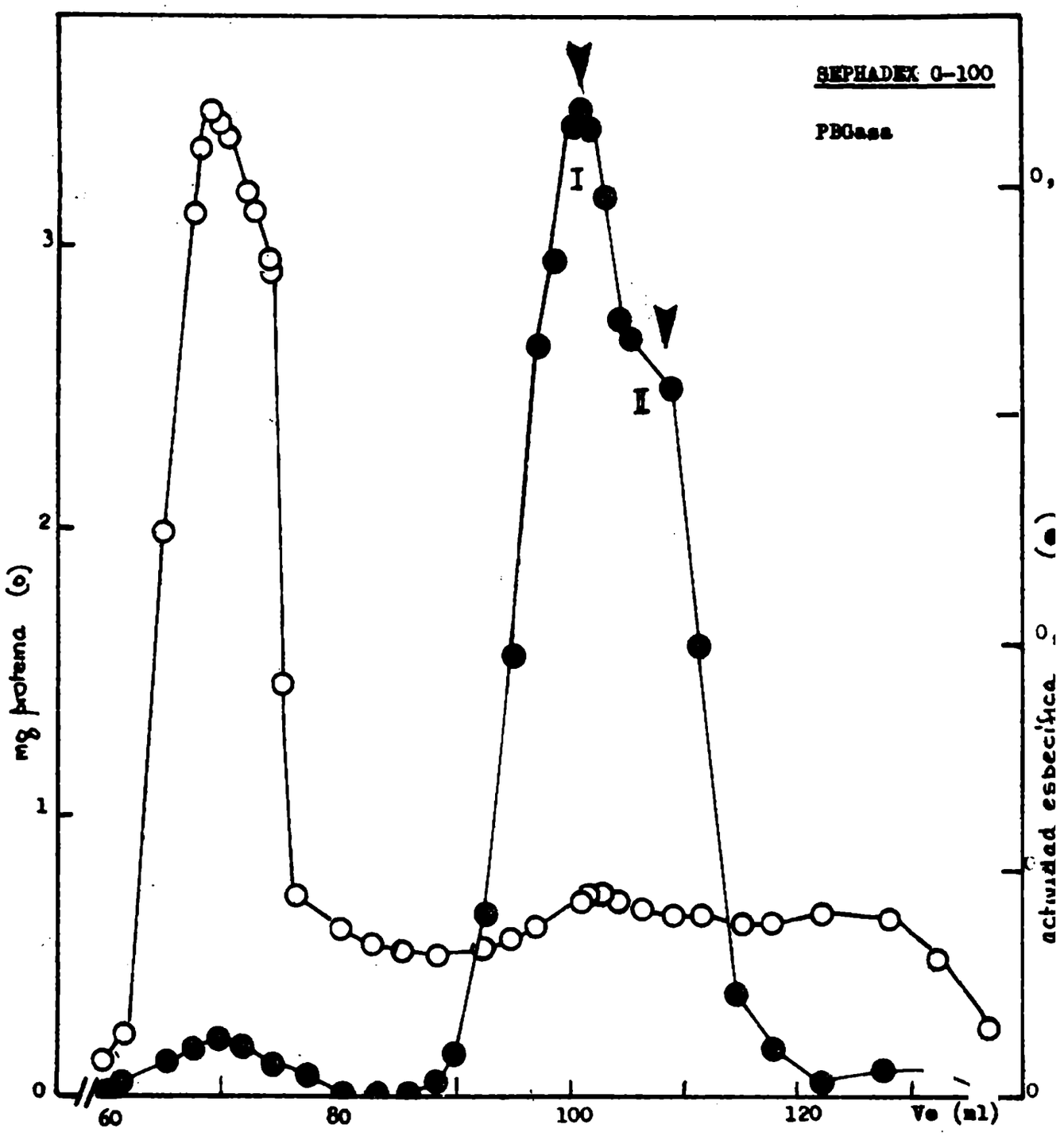


Figura 93: Cromatografía de la fracción 30-80%, correspondiente a la etapa 4 (Tabla XXXIX) de la purificación de la PBGasa de Pallet, a través de una columna de Sephadex G-100. Las condiciones experimentales son las standard. Contenido proteico (o) y actividad específica (●)

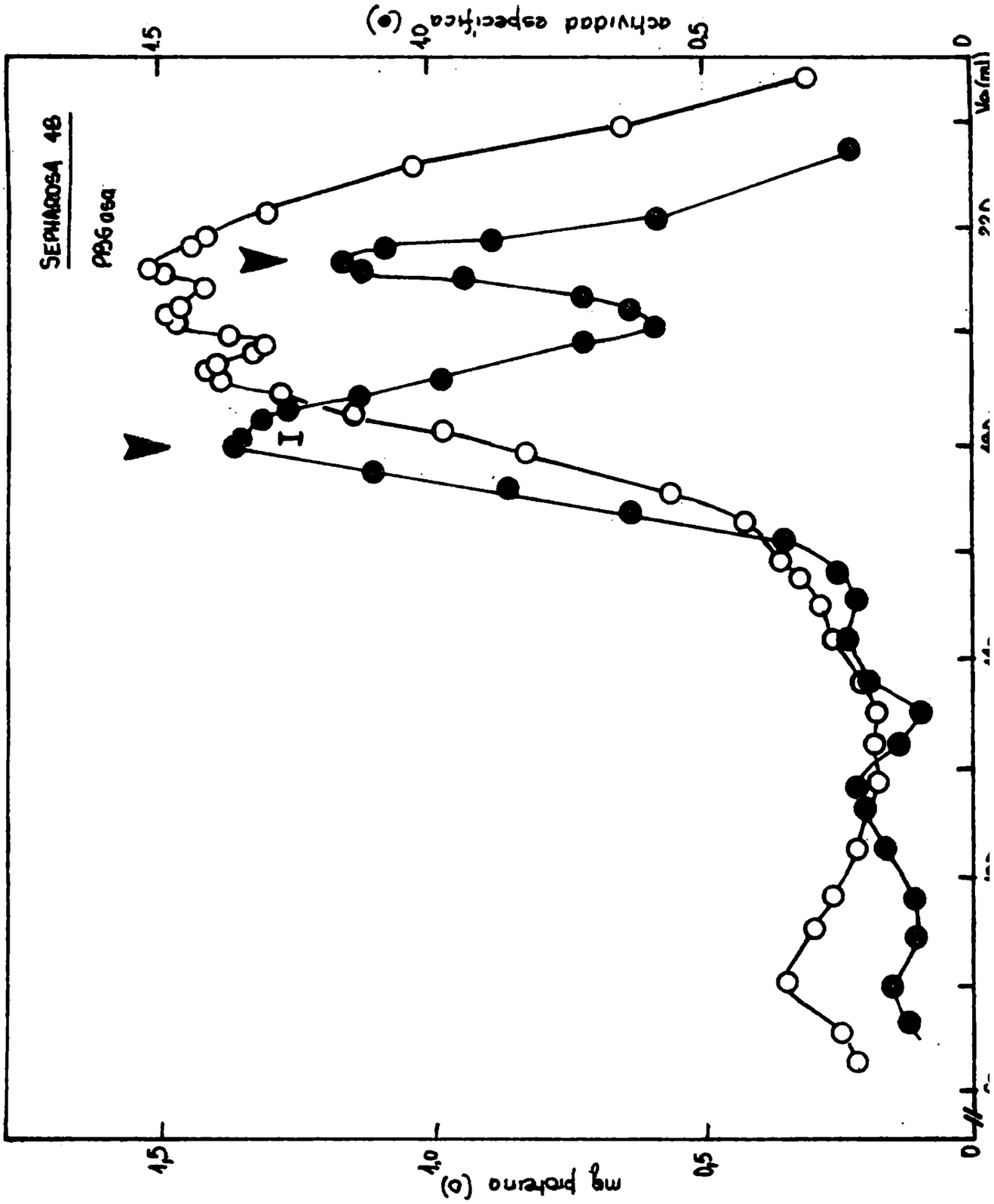


Figura 94: Cromatografía de la fracción 30-80%, correspondiente a la etapa 4 de purificación de la PBGasa de Pellet; a través de una columna de Sepharosa 4B. Las condiciones experimentales son las standard. Contenido proteico (o) y actividad especifica (•)

Tabla XXIII : Cuadro de purificación de la PBG-asa de Pellet

Etapa	nmoles porfirinas	actividad específica	Proteínas totales(mg)	Unidades totales	Grado de purificación	Porfirinas formadas		Peso molecular
						% URO III	% URO I	
1. Homogenato	0,357	0,011	3900,8	11,70	1	—(*)	—	—
2. Pellet	1,095	0,058	1935,5	111,70	5	95	5	—
3. Sobr. de SCN^-	0,196	0,221	365,9	80,97	19	100	—	—
4. 30-80% sulfato amonio	1,149	0,733	80,12	58,72	63	100	—	—
5A. Sephadex G 100								
Banda I	0,868	6,338	4,14	26,23	539	100	—	50.000
Lomo II	0,656	3,514	4,57	16,06	300	100	—	25.000
5B. Sepharosa 4B								
Banda I	1,381	2,440	3,12	7,61	208	100	—	50.000
Banda II	1,187	1,101	4,28	4,71	94	100	—	25.000

(*) En el Homogenato se encontró 100% de porfirinas decarboxiladas, predominando Copro III (95%)

condiciones aeróbicas, obteniéndose resultados similares, es decir, al igual que se había observado con el pellet original, en el cual la PBGasa igualmente activa en presencia o ausencia de aire, lo mismo se hace extensivo a la enzima extraída del pellet y a las sucesivas preparaciones obtenidas durante el proceso de su purificación.

II.- 4.- AISLAMIENTO, PURIFICACION Y PESOS MOLECULARES DE LA DEAMINASA.

II.- 4.- 1.- Efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento sobre el tipo isomérico y las porfirinas formadas:

Uno de los procedimientos más frecuentemente empleados para la purificación de la Deaminasa consiste en someter al calentamiento las preparaciones conteniendo el complejo de la PBGasa, siendo la Isomerasa termolábil se separa así fácilmente la Deaminasa por destrucción de la primera.

En el caso de Euglena, observamos que la PBGasa de sobrenadante se encuentra formando un agregado difícil de resolver, con las Decarboxilasas. Como sabemos que en general estas últimas enzimas son también sensibles al calentamiento y como además era necesario establecer cuál era el periodo y temperaturas óptimas para la obtención de la Deaminasa libre de Isomerasa, se intentó determinar si era posible ajustar ambas variables de manera tal que pudiéramos obtener: 1°) Una preparación libre de Decarboxilasas y con suficiente Isomerasa activa, esto sería factible siempre y cuando las Decarboxilasas fueran más termolábiles que la Isomerasa; 2°) Una preparación de Deaminasa lo más activa posible y libre de Isomerasa. Para ello, empleando la fracción 30-8-% de sulfato de amonio obtenida de sobrenadante y desalada por G-25, se sometió a distintas temperaturas en baños con agitación constante, durante intervalos variables, como se ilustra en la Tabla XXIV. Al cabo de cada periodo se enfrió la preparación inmediatamente en baño de hielo y se centrifugó 10 minutos a 24.000 x g. Luego se determinó la actividad en el sobrenadante en las condiciones standard.

Se observó que por el calentamiento las proteinas totales no disminuyeron significativamente ni aún entre los tiempos y temperaturas extremos. Notablemente ya al menor tiempo y temperatura, 5 minutos a 55°C, fué notable el ya reportado efecto de activación por calentamiento, tres veces comparándolo con el control, y además la casi total inactivación tanto de las Decarboxilasas como de la Isomerasa. A 55°C la actividad específica crece al aumentar el lapso de calentamiento.

Para 60° el grado de activación fué aún mayor y máximo a los 15 minutos, en tanto que para 65° se encuentra un valor del mismo orden al menor tiempo para luego decrecer a tiempos mayores.

De acuerdo con estos resultados, no se tuvo éxito en cuanto a encontrar las condiciones para destruir primero y selectivamente las Decarboxilasas pues aparentemente son tan "lábiles" como la Isomerasa, pero se adoptó como condición óptima para la inactivación de la última, un calentamiento a 60°C durante 15 minutos.

Tabla XXIV : Efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento sobre el tipo isomérico y las porfirinas formadas.

Temperatura (°C)	Tiempo calentam. (min)	nmoles porfirinas / mg proteína	µg PBG consumido / mg proteína	Porfirinas formadas		
				%URO III	%URO I	%Decarb
37	—	0,204	0,614	60	—	40
55	5	0,512	1,846	5	95	—
	10	0,595	1,568	5	95	—
	15	0,570	1,798	2	98	—
	20	0,716	1,557	2	98	—
60	5	0,625	2,130	5	95	—
	10	0,804	1,609	5	95	—
	15	0,865	2,602	5	95	—
	20	0,707	2,020	2	98	—
65	5	0,839	3,006	2	98	—
	10	0,745	2,242	2	98	—
	15	0,769	1,936	2	98	—
	20	0,725	1,930	2	98	—

Como proteína enzimática se empleó la fracción 30-80% de sulfato de amonio obtenida a partir de Sobrenadante.

II.- 4.- 2.- Purificación de la Deaminasa de sobrenadante por tratamiento con ácido acético:

Como en los casos anteriores no vamos a describir los ensayos preliminares relacionados con la purificación de la Deaminasa, tan solo discutiremos lo referente al periodo y temperatura de calentamiento, pues esperábamos como se dijo, destruir selectivamente las enzimas contaminantes y además se confirmó el ya reportado fenómeno de activación de la Deaminasa por simple calentamiento.

De acuerdo con nuestra experiencia, el tratamiento con acético glacial en ciertas condiciones produce una buena purificación de estas enzimas, de manera que se desarrolló una secuencia para el caso de la Deaminasa, partiendo de la fracción sobrenadante, que incluyó dicho tratamiento, cuyos pasos se ilustran en la Tabla XXV; describiremos a continuación solo aquellos a los cuales no nos hayamos referido ya al ocuparnos de la PBGasa.

Etapa 1: Homogenata.

Etapa 2: Sobrenadante.

Etapa 3: Sobrenadante de ácido acético: El sobrenadante de la etapa anterior se trató con ácido acético glacial, lentamente gota a gota y con agitación continua hasta llevarlo a pH 5. Controlando el agregado con un pHmetro Knick sumergido en la mezcla, esta se dejó agitando por un espacio adicional de 30 minutos y luego se centrifugó durante 10 minutos a 11.000 x g, obteniéndose un nuevo sobrenadante y un pellet. Como control el pellet se lavó dos veces con buffer fosfato por suspensión y centrifugación, reuniéndose finalmente los lavados.

Etapa 4: Fracción 30-80% de sulfato de amonio: El sobrenadante del tratamiento con acético se precipitó entre 30-80% de acuerdo con la técnica usual. El precipitado proteico se desaló por Sephadex G-25 grueso.

Etapa 5: Sobrenadante de calentamiento: El eluído de la etapa anterior se calentó 15 minutos a 60° enfriándose inmediatamente en baño de hielo y eliminando la proteina precipitada por centrifugación; el sobrenadante constituía una rica fuente de Deaminasa. Generalmente se volvía a concentrar por precipitación hasta 80% de saturación con sulfato de amonio.

Etapa 6A: Cromatografía por Sephadex G-100: El producto de la Etapa 5 se corrió por Sephadex G-100. Los resultados se ilustran en la Figura 95, como es usual con esta columna, el grueso de proteina sale primero de manera que se obtiene una banda muy activa de Deaminasa (I) altamente purificada (1.200 veces), con un peso molecular de 40.000; aparece acá también un pico muy pequeño o lomo II, que saldría en la posición de una proteina de peso molecular 20.000.

Etapa 6B: Cromatografía por Sepharosa 4B: La proteina del sobrenadante de calentamiento corría en una columna de Sepharosa 4B mostró los perfiles que se observan en la Figura 96. la curva de proteinas es del tipo ya visto, en tanto que la Deaminasa salió prácticamente dentro de una sola banda, bien definida, a los 40.000 de peso molecular y con una purificación de más de 400 veces, menor que con Sephadex, pero siempre vemos que en Sepharosa la mayor parte de la proteina sale en la misma zona en la cual eluye la enzima. Ese diminuto pico que se insinúa al final caería dentro del rango de peso molecular 20.000, pero su proporción es insignificante como para darle demasiada importancia.

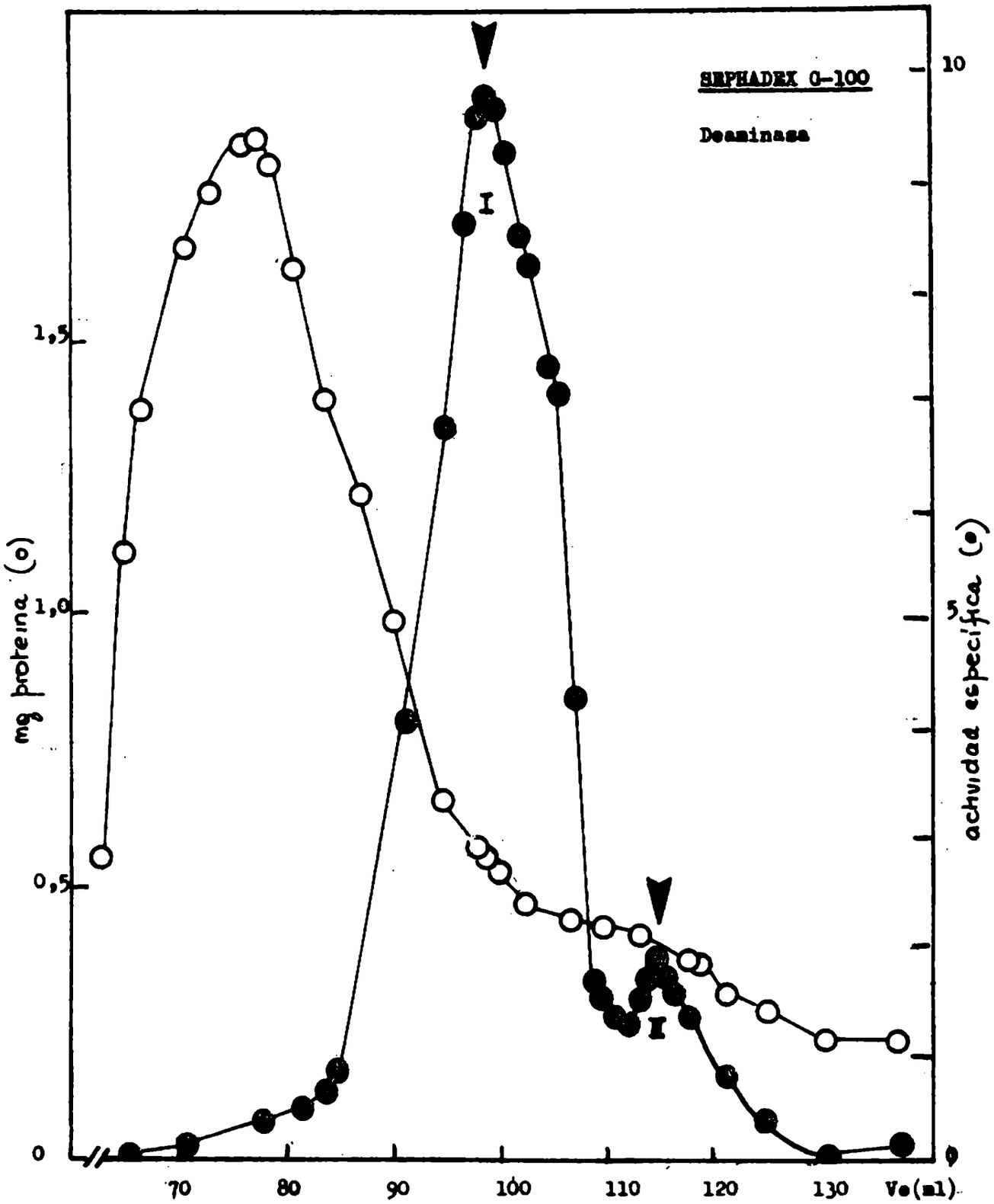


Figura 95: Cromatografía de la fracción sobrenadante de calentamiento, correspondiente a la etapa 5 (Tabla XXV) de la purificación de Deaminasa de Sobrenadante sometida a tratamiento ácido; a través de una columna de Sephadex G-100 . Contenido proteico (o) y actividad especifica (•)

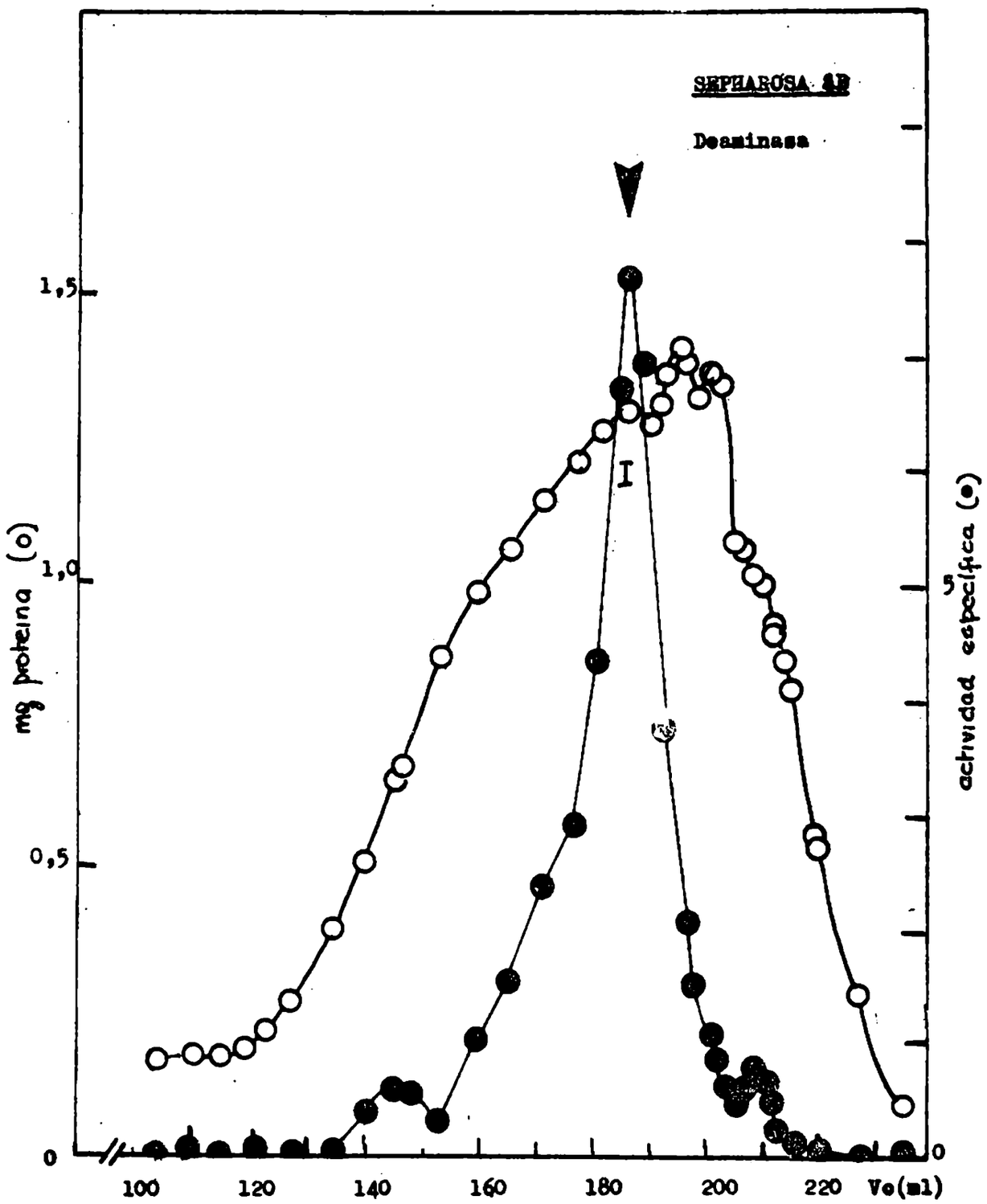


Figura 96: Cromatografía de la fracción sobrenadante de calentamiento correspondiente a la etapa 5 (Tabla XXV) de la purificación de Deaminasa de Sobrenadante, sometida a tratamiento ácido; a través de una columna de Sepharosa 4B. Contenido proteico (o) y actividad específica (•).

Tabla XXV : Cuadro de purificación de la Deaminasa de Sobrenadante con tratamiento con ácido acético.

Etapa	Δ nmoles porfirinas	actividad específica	Proteínas totales (mg)	Unidades totales	Grado de purificación	Porfirinas formadas			Peso molecular
						%URO I	%URO III	%Decarb	
1. Homogenato	0,920	0,0122	6139,1	74,99	1	—	—	100	—
2. Sobrenadante	3,719	0,0634	4222,6	267,80	5,2	—	—	100	—
3. Sobr. de AcOH	3,757	0,2010	1093,2	219,76	16,5	—	—	100	—
Pellet de AcOH	1,808	0,060	2078,0	125,63	—	—	20	80	—
4. 30-80% sulfato de amonio	6,67	0,237	817,1	193,37	19,4	—	65	35	—
5. Sobr. de calentamiento	36,27	1,877	405,7	761,59	153,8	85	15	—	—
6A. Sephadex G100 Banda I	9,77	14,910	6,6	98,00	1222	90	10	—	40.000
Lomo II	1,75	3,500	2,5	8,75	288	85	15	—	20.000
6B. Sepharosa 4B Banda I	8,86	5,139	34,0	174,00	421	95	5	—	40.000

II.- 4.- 3.- Purificación de la Deaminasa de sobrenadante sin tratamiento con ácido acético:

Todos los ensayos anteriores indicaban que también con esta Deaminasa el tratamiento con acético era una etapa conveniente y producía una purificación de tres veces con respecto a la anterior; sin embargo se hicieron también varios ensayos omitiendo esta etapa para observar comparativamente si había o no cambios significativos. Los resultados se muestran en la Tabla XXVI. La secuencia de etapas es la misma que la de la Tabla XXV, excepto que falta, como acabamos de aclarar el tratmiento con acético. Se observa que prácticamente se obtiene el mismo grado de purificación que antes y por otro lado, el perfil de elución por cromatografía en G-100 (Figura 97), si bien no es coincidente pues la proteína sale algo más distribuída, aparece una banda principal más ancha a los 40.000 de peso molecular, con un hombro a menores pesos moleculares; pero el grado de purificación en esta última etapa es del mismo orden que en el caso anterior aunque se ha evidenciado menos el pico de peso molecular 20.000.

II.- 4.- 4.- Purificación de la Deaminasa de pellet, extraída con un agente caotrópico y sin tratamiento con ácido acético:

Es evidente que aplicando o no la etapa del tratamiento con acético en el proceso de purificación de la Deaminasa se podía obtener una preparación altamente purificada de esta enzima con un peso molecular de 40.000, que por la forma de la curva de elución sugeriría la existencia, aunque en mucha menor proporción, de especies moleculares de peso 20.000. Es interesante por otro lado, averiguar si se podía obtener una Deaminasa similar a partir de la fracción pellet ya teníamos resuelto el aspecto de la extracción de la PBGasa de esa fuente, de manera que para la purificación de la Deaminasa omitimos en este caso el paso de tratamiento con acético y hasta la Etapa 4 el procedimiento fué el mismo que el aplicado para la PBGasa (Tabla XXIII), luego se sometió a calentamiento y finalmente se corrió por Sepharex. Como se muestra en la Tabla XXVII, el grado de purificación final fué nuevamente alto (1.200 veces) para una fracción que formó 100% de Uro I. En la Figura 98, se observa qué la elución de la proteína es parecida a la de la Figura 97, pero aquí se define mejor la banda más activa I de peso molecular 40.000 y el lomo II a 20.000.

Es importante también aclarar que, análogamente a lo que habíamos observado con la PBGasa de pellet, una vez llegada a la etapa de obtención de una preparación parcialmente purificada de Deaminasa, que formara más de 80% de Uro I, o partiendo de pellet, los datos de actividad obtenidos en incubaciones anaeróbicas (los tabulados) o aeróbicas fueron del mismo orden o con frecuencia coincidentes. Es decir la presencia o no de aire no afecta la actividad de la Deaminasa de Euglena.

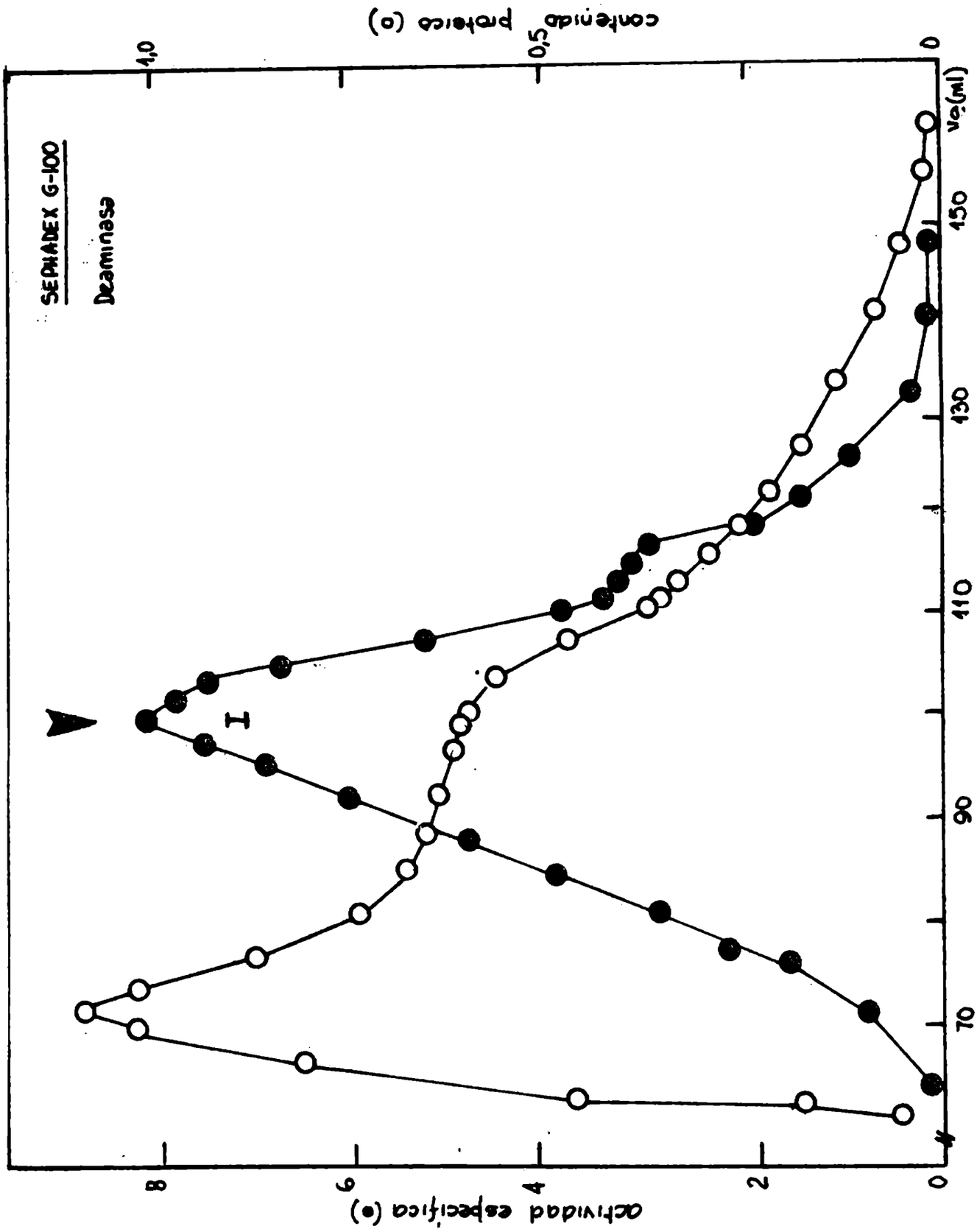


Figura 97: Cromatografía de la fracción sobrenadante de calentamiento (etapa 4, Tabla XXVI) de la purificación de Deaminasa a partir de Sobrenadante (sin tratamiento ácido) a través de una columna de Sephadex G-100. Contenido proteico (o) y actividad especifica (e).

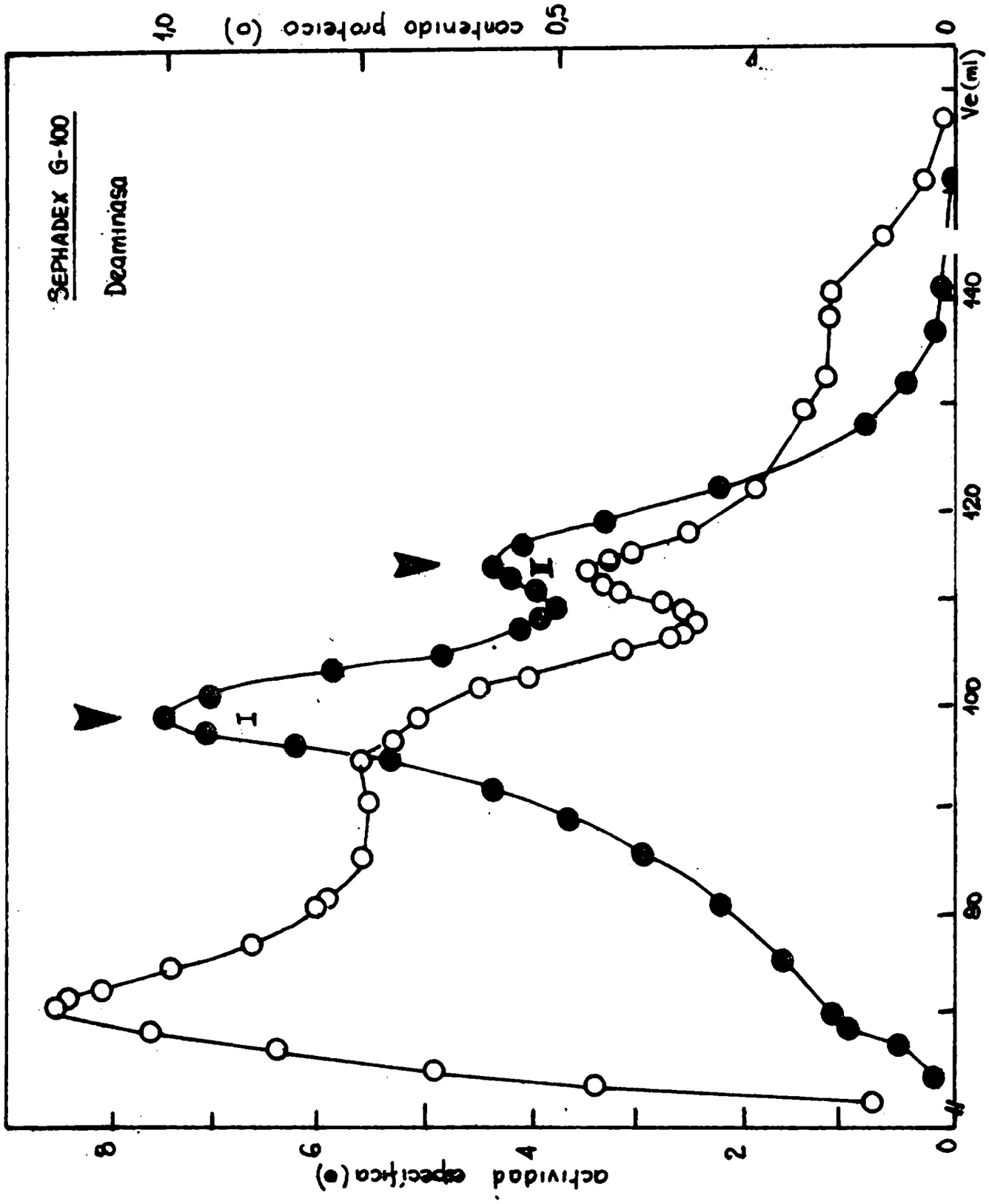


Figura 98: Cromatografía de la fracción sobrenadante de calentamiento (etapa 5, Tabla XXVII) de la purificación de Deaminasa de Pellet (sin tratamiento ácido), a través de una columna de Sephadex G-100. Contenido proteico (o) y actividad enzimática (e).

Tabla XXVI : Cuadro de purificación de la Deaminasa de Sobrenadante sin tratamiento con ácido acético.

Etapa	Δ nmoles porfirinas	actividad específica	Grado de purificación	Porfirinas formadas		Peso molecul
				%URO III	% URO I	
1. Homogenato	0,820	0,0089	1	—	—	—
2. Sobrenadante	2,805	0,0476	5,3	—	—	—
3. 30-80% sulfato de amonio	2,788	0,0862	9,7	70	—	—
4. Sobrenadante de calentamiento	17,150	1,625	183	10	90	—
5. Sephadex G 100						
Banda I	7,508	12,840	1442	5	95	40.000

Tabla XXVII : Cuadro de purificación de la Deaminasa de Pellet, extraído con SCN^-, sin tratamiento con ácido acético.

Etapa	Δ nmoles porfirinas	actividad específica	Grado de purificación	Porfirinas formadas		Peso molecula
				%URO III	% URO I	
1. Homogenato	0,557	0,0128	1	—	—	—
2. Pellet	1,190	0,0479	3,7	100	—	—
3. Sobrenadante de SCN^-	0,281	0,1366	12,8	100	—	—
4. 30-80% sulfato de amonio	4,139	0,1994	15,6	100	—	—
5. Sobrenadante de calentamiento	11,678	1,4358	112,1	10	90	—
6. Sephadex G 100						
Banda I	6,870	15,361	1200	—	100	40.000
Lomo II	4,507	2,831	220	10	90	20.000

II.- 4.- 5.- La Deaminasa es un dímero de peso molecular 40.000:

Indudablemente en todos los casos, se ha encontrado que la especie molecular predominante de la Deaminasa es la de peso molecular 40.000, valor que coincide con los hallados en nuestro laboratorio para la Deaminasa de otras fuentes (Llambías y Batlle, 1971a,b; Sancovich et al, 1977) y por otros autores (Jordan y Shemin, 1973) pero es evidente que la Deaminasa de peso molecular 40.000 existiría en equilibrio con una forma de peso molecular 20.000. Solamente Frydman y Feinstein (1975) habían encontrado hasta ahora un dato de 20.000 para esta enzima y en nuestro laboratorio se había demostrado disociación de la especie de 40.000 en otra de 20.000 (Llambías y Batlle, 1971a,b).

Es muy probable entonces que la Deaminasa esté constituída por dos subunidades iguales de peso molecular 20.000 que normalmente se encuentren como el dímero activo de 40.000, aunque aparentemente no sería necesaria la formación del oligómero para que la enzima fuese activa, y tal vez en algunos organismos o tejidos, la unidad mínima funcional fuese el monómero de peso molecular 20.000.

II.- 5.- PREPARACION DE ISOMERASA Y SU PESO MOLECULAR.

Un procedimiento que ha tenido bastante éxito para la obtención de preparaciones con actividad de Isomerasa, ha sido el fraccionamiento salino con sulfato de amonio a niveles de saturación superiores al 70%. De allí que partiendo de sobrenadante se llevaron a cabo algunos ensayos tendientes a detectar actividad de Isomerasa en las fracciones 70-90 y 80-90% de saturación de sulfato de amonio. Sabemos que la Isomerasa es incapaz de usar al PBG como sustrato, pero en presencia de Deaminasa produce normalmente Uroporfirinógeno III, siempre que se encuentre en la relación apropiada.

De estos primeros estudios se encontró (Tabla XXVIII) que la fracción 70-90% tenía todavía actividad del complejo, en tanto que la 80-90% poseía mucho menos; en cambio agregadas ambas a la Deaminasa producían mayor cantidad de porfirinas y revertían el tipo de isómero de I a III. De manera que se pensó en reunir la fracción 80-90% para luego someterla a una cromatografía en Sephadex con el objeto de ver si se lograba separar completamente la Isomerasa y tener una idea de su peso molecular.

Para ello se emplearon fracciones 80-90% de saturación con sulfato de amonio, provenientes de sobrenadante con y sin tratamiento con ácido acético, es decir la primera se obtuvo siguiendo los mismos pasos de la purificación de la PBGasa de sobrenadante (Tabla XXII) hasta la Etapa 3, (1. Homogenato; 2. Sobrenadante; 3. Fracción 30-80% de sulfato de amonio); en tanto que la segunda preparación siguiendo los mismos pasos de la purificación de Deaminasa de sobrenadante con tratamiento con ácido (Tabla XXV), hasta la Etapa 4, (1. Homogenato; 2. Sobrenadante; 3. Sobrenadante de acético; 4. Fracción 30-80% de sulfato de amonio). En ambos casos se había llegado a obtener un precipitado de 30-80% de saturación y un sobrenadante. Este último se llevó entonces a 90% de saturación con sulfato de amonio sólido de acuerdo con la técnica usual, reco-

Tabla XXVIII : Detección de Isomerasa.

Mezcla	nmoles de porfirinas	% URO I	% URO III
D	3,0361	83	17
70-90%	1,1182	—	100
70-90% + D	8,5045	—	100
80-90%	0,1191	—	—
80-90% + D	7,6372	20	80

giéndose finalmente por centrifugación. De esa forma se obtuvieron la fracción 80-90% sin tratamiento con ácido acético (80-90% sin AcOH) y con tratamiento (80-90% con AcOH), que se cromatografiaron por Sephadex G-100.

En la Figura 99 se ilustran los resultados obtenidos con la preparación 80-90% sin tratamiento con ácido. Como se aclara en la leyenda, en cada eluato se midió actividad en ausencia (□) y presencia de Deaminasa (■). En ausencia la preparación no estaba completamente libre pues se detectó cierta actividad aunque muy baja. Cuando se le agregó Deaminasa se representaron los datos de actividad total (■) y los que se obtuvieron de restar en cada eluato (o), el valor de actividad producido por elcorrespondiente control de la cantidad de Deaminasa añadida en cada caso, incubada separadamente.

Si tenemos en cuenta el Δ de actividad que sería lo más correcto aparece un pico bien definido (I-I) que correspondería decididamente a la Isomerasa, eluyendo a un valor de peso molecular de 30.000, formando 100% de Isómero III. Representamos también la curva de actividad total, es decir sin descontar los blancos de Deaminasa pues revelaba, llamativamente una banda máxima (T-I) coincidente con la anterior (I-I), una segunda (T-II) que formaba cerca de 50% de Uro III y estaría en la zona de los 20.000 de peso molecular, y otras tres (T-III, T-IV y T-V) también produciendo 30-40% de Uro III, que caían fuera de la curva de calibración, de manera que sus pesos moleculares debían ser del orden de 15.000 o menores. Resultados muy recientes llevados a cabo con otras columnas de Sephadex, calibradas para pesos moleculares que permitían resolver mejor a valores menores, han confirmado la presencia en la fracción 80-90% de especies de pesos moleculares de 5.000, 10.000 y 15.000, que corresponderían entonces a las bandas T-V, T-IV y T-III, de la corrida ilustrada en la Figura 99. Si bien estaba claro que la especie molecular de la Isomerasa predominante y aparentemente única, según la curva inferior, sería la de peso molecular 30.000, el hecho de que surgieran bandas bastante definidas al considerar la afinidad total de la mezcla de Deaminasa y el eluato (curva superior), podría estar sugiriéndonos la posibilidad de la existencia de otras especies de Isomerasa de pesos moleculares menores, 20.000, 15.000, 10.000 y 5.000.

En la Figura 100 se muestran los perfiles de elución proteico y de actividad para la fracción 80-90% con tratamiento con ácido acético. Como en la Figura 99 y en todos los casos anteriores tratándose de una columna de Sephadex G-100, el grueso de las proteinas sale primero y luego aparecen aquí cuatro bandas, de ellas la I y la II, si bien son datos de actividades netas es decir descontados los controles de Deaminasa, corresponden o bien a Deaminasa o más probablemente a la PDGasa también presente en la fracción 80-90% cromatografiada, pues observemos que se había detectado actividad en esas mismas zonas sin agregado de Deaminasa y digamos que la proporción de Uro I a Uro III formada fué de 70-30 y 80-20 para I y II, (la Deaminasa empleada producía 90% de Uro I), además los pesos moleculares correspondientes eran 70.000 y 50.000 respectivamente.

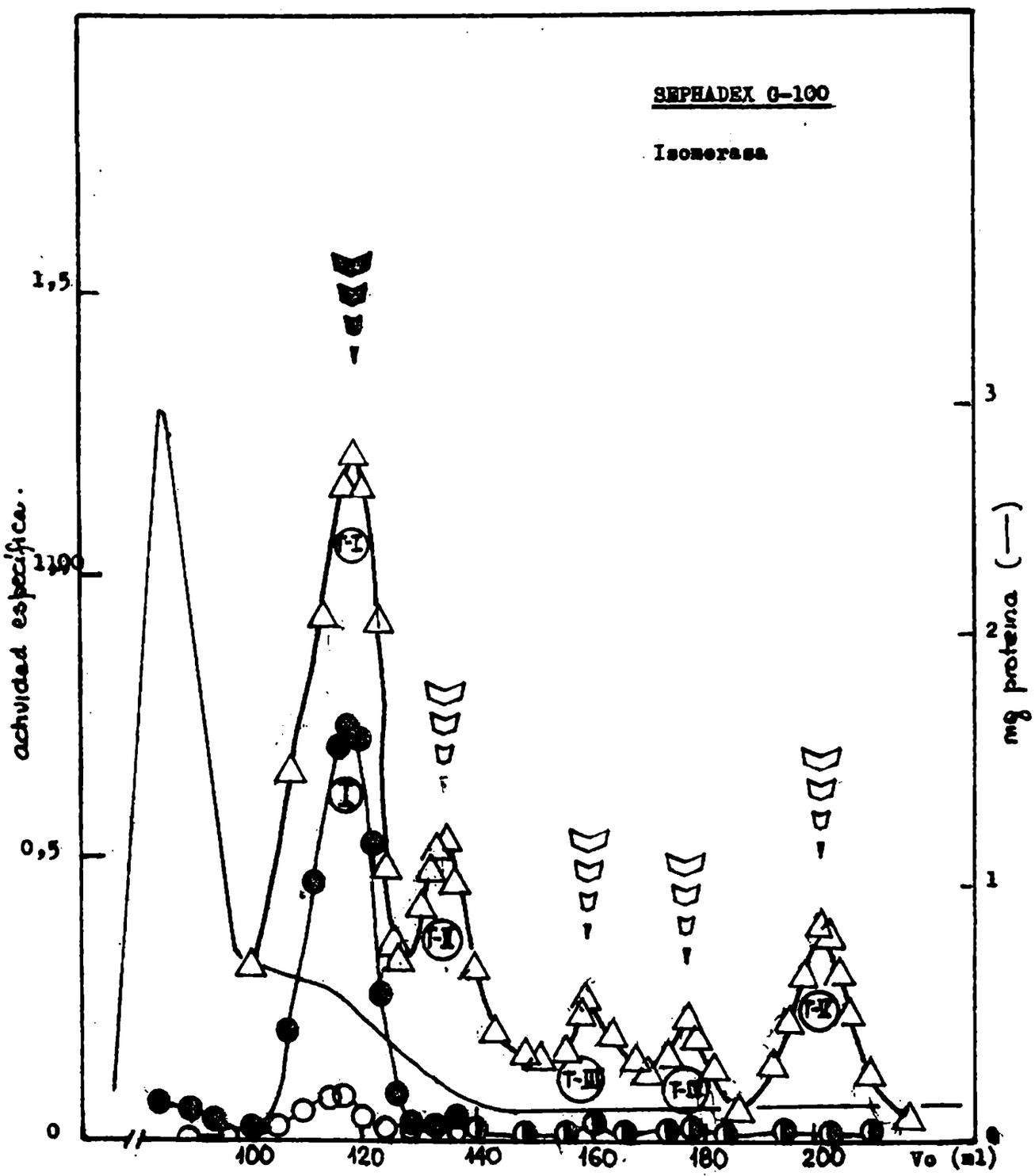


Figura 99: Cromatografía de la fracción 80-90% de saturación con sulfato de amonio, obtenida de Sobrenadante, sin tratamiento ácido, en la separación de Isomerasa, a través de una columna de Sephadex G-100. En cada eluato se midió actividad en ausencia y presencia de Deaminasa , en este último caso, la Deaminasa se agregó en la relación 4:1 (mg:mg) de Deaminasa a eluato. La Deaminasa empleada fue una preparación purificada de Sobrenadante sin tratamiento ácido, hasta la etapa de calentamiento, que producía 95% de Ureá I. Contenido proteico (—). Actividad sin agregado de Deaminasa (o), Δ de actividad con agregado de Deaminasa (o), estos datos se obtuvieron descontando a la actividad total medida en cada eluato, por adición de Deaminasa, el valor producido por el correspondiente control de la Deaminasa agregada.(Δ)•Actividad total, resultante del agregado de Deaminasa a cada eluato.

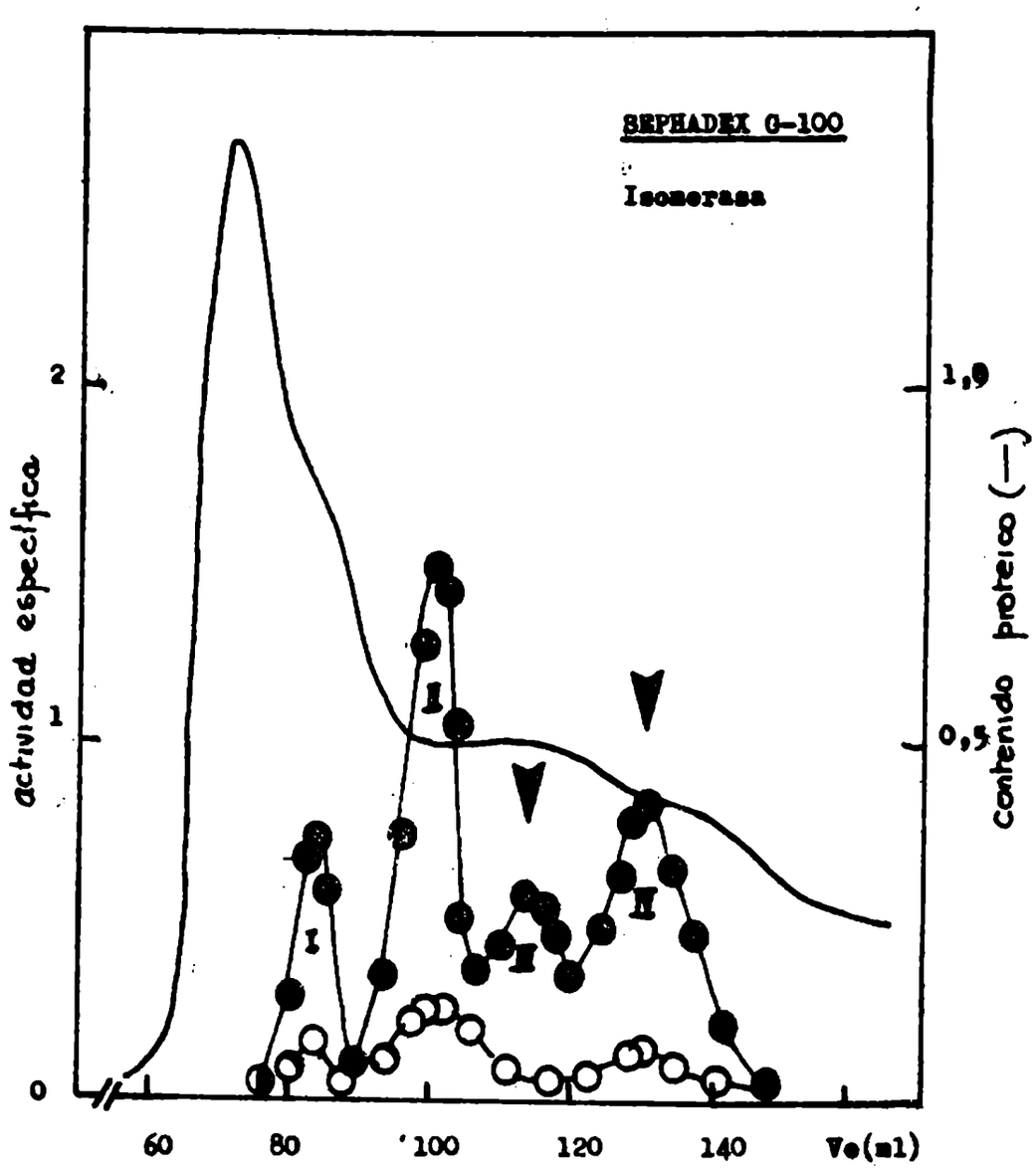


Figura 100: Cromatografía de la fracción 80-90% obtenida de Sobrenadante con tratamiento ácido, en la separación de Isomerasa, a través de una columna de Sephadex G-100. Las condiciones experimentales son las standard o las detalladas en la Figura 99. Contenido proteico (—), Actividad del eluate sin agregado de Deaminasa (o), Actividad neta con agregado de Deaminasa, y descontado el blanco de Deaminasa (●).

En cambio, las bandas III y IV formaban casi exclusivamente Isómero III, por lo cual nos atreveríamos a asegurar que se trata de Isomerasa y en este caso se calculó un peso molecular de 30.000 para la banda III y 20.000 para la IV.

Debemos quizás aclarar también aquí, que para poder llevar a cabo con éxito cada una de estas corridas cromatográficas fué preciso obtener una cantidad de proteina del orden de los 30-40 mg como mínimo, para lo cual se hubo de reunir fracción 80-90% (con y sin tratamiento con ácido acético), proveniente de un número considerable de experiencias separadas de purificación, dado que la cantidad obtenida de cada batch en esa fracción, es muy pequeña y por otro lado hay limitaciones en cuanto a la masa de células de la cual se puede y se debe partir en cada ensayo.

De acuerdo con el análisis de estos resultados, se aprecia que en el caso de Euglena es difícil aunque no imposible, obtener una preparación purificada de Isomerasa.

Aparentemente, la especie molecular más abundante en los extractos de células de Euglena gracilis tendría un peso molecular de 30.000; sin embargo, hay fuertes evidencias de la existencia de especies con pesos moleculares menores, de 20.000 y podríamos agregar hasta de 15.000, 10.000 y 5.000.

Recordemos que la Isomerasa aislada de callos de soya, presentaba una gran tendencia a la formación natural de agregados de pesos moleculares muy altos (de hasta 200.000) (Llambías y Batlle, 1971a), si bien en ciertas condiciones para esta misma enzima, se obtuvieron valores de pesos moleculares muy bajos (6.000, 12.000, 24.000) (Llambías y Batlle, trabajo no publicado). Por otro lado la Isomerasa de eritrositos de aves mostró un comportamiento análogo, por cuanto los datos de pesos moleculares eran del orden de 70.000 a 280.000 (Llambías y Batlle, 1971b) y más recientemente Higuchi y Bogorad (1975) han reportado algunas evidencias preliminares de que la Isomerasa de espinaca aparentemente tendría un peso molecular de 60.000 aunque también podría ser el resultado de una asociación de varias subunidades.

Todo esto, nos está sugiriendo por un lado, que una vez aislada la Isomerasa posee una fuerte tendencia a la agregación, aunque es probable que "in vivo" esto no suceda en igual grado; por otro lado la Isomerasa, considerada como uno de los dos componentes de la PBGasa, debe ser un polipéptido de bajo peso molecular para el cual nosotros proponemos el valor de 5.000 dalton y enseguida justificaremos más aún esta hipótesis.

II.- 6.- EN EL COMPLEJO DE LA PBGasa, LA DEAMINASA Y LA ISOMERASA SE ENCUENTRAN EN UNA RELACION MOL A MOL.

Se ha visto que existe bastante acuerdo en cuanto al peso molecular de la Deaminasa y hemos aquí propuesto, que la Deaminasa es un dímero de peso molecular 40.000, si bien los monómeros de peso molecular 20.000 también serían

activos.

Por otra parte, ya notamos, que no había datos suficientes acerca del peso molecular de la Isomerasa y al mismo tiempo que los reportados eran inconsistentes con los valores de peso molecular encontrados para la PBGasa de iguales fuentes; así por ejemplo para la PBGasa de callos era del orden de 25.000 y para la de eritrositos de aves, de aproximadamente 100.000, mientras que para las respectivas isomerasas, recién comentamos, dieron cifras de 210.000, 6.000, 12.000, 24.000 en callos y 280.000-70.000 en eritrocitos. Esto fué lo que nos llevó a sugerir que la Isomerasa aislada se agregaba más o menos fácilmente según las condiciones experimentales. Con Euglena podemos que se ha confirmado esto último y con todos los datos obtenidos, hemos propuesto que la Isomerasa es un polipéptido de peso molecular 5.000. Sin embargo, se agrega fácilmente cuando está sola, "In vitro", hasta una especie de peso molecular 30.000, que es en realidad la predominante o única.

¿Cómo se explica entonces que encontremos pesos moleculares de 50.000 (especie más activa) y 25.000 para la PBGasa de Euglena, si la Deaminasa tiene 40.000 o aún aceptemos 20.000 y la Isomerasa 30.000? Este mismo interrogante ya fué planteado antes, cuando la PBGasa de callos se comportaba como una entidad de peso molecular 25.000 y para su Deaminasa e Isomerasa se habían determinado valores de 40.000 y 210.000 respectivamente; o en el caso de la PBGasa de eritrocitos de aves con un peso molecular de 100.000, una Deaminasa de 40.000 y una Isomerasa de 70.000 y 280.000; algo similar se observó con las mismas enzimas de hígado bovino (Sancovich et al, 1969, 1976 y resultados no publicados), donde la PBGasa tenía peso molecular 50.000, la Deaminasa 40.000 y la Isomerasa 210.000, 70.000 y 30.000.

Nosotros creemos que hemos encontrado la respuesta a esta aparente incongruencia o por lo menos estamos muy cerca de ella y esta respuesta ha surgido, evidentemente de los resultados aquí obtenidos.

Según nuestra hipótesis, cuando la PBGasa actúa "In vivo" y muy probablemente "In vitro" también, lo hace de manera tal, que debe existir una relación de: 1 MOL DE DEAMINASA A 1 MOL DE ISOMERASA. Se define un mol de cada componente como la unidad molecular mínima, en otras palabras lo que podríamos llamar la subunidad. En el casode la Deaminasa su subunidad es una proteina de peso molecular 20.000 y en el de la Isomerasa, su subunidad es un polipéptido de peso molecular 5.000.

Teniendo en cuenta esta hipótesis la especie molecular mínima, llamémoslo el monómero de la PBGasa debería tener un peso molecular de 25.000. De todas maneras, lo importante es que la relación Deaminasa:Isomerasa en el complejo debe ser 1:1, o bien mol:mol. Los resultados obtenidos, llevando a cabo una serie de ensayos, en los cuales se varió dicha relación y se estudió su efecto sobre el tipo isómero formado y la actividad (Tabla XXIX), han aportado datos que apoyan experimentalmente nuestra teoría.

Tabla XXIX : Estudio de la relación Deaminasa:Isomerasa sobre el tipo de isómeros formados.

Sistema	Relación D : I		actividad específica	Tipo isómerico	
	mg:mg	mol : mol		% I	% III
1. D	---	---	1,120	90	10
2. I	---	---	0,034	---	---
3. D + I	8:1	2;1	1.140	80	20
4. D + I	4:1	1:1	2,016	5	95
5. D + I	4:2	1:2	1,176	10	90
6. D + I	4:3,4	1:3,4	0,887	---	100
7. D + I	4:4,0	1:4	0,742	---	100
8. D + I	4:4,5	1:4,5	0,741	---	100
9. D + I	4:6,7	1:6,7	0,745	---	100
10. D + I	4:8	1:8	0,743	---	100

La Deaminasa se purificó de sobrenadante sin tratamiento con acético. La fracción 80-90% utilizada como fuente de Isomerasa se preparó también de sobrenadante sin tratamiento con acético. Se tomaron como pesos moleculares de los monómeros de Deaminasa ó Isomerasa 20.000 y 5.000 respectivamente.

Observamos que, en exceso de Deaminasa (Expt 3) no se modifican sensiblemente, ni el tipo isomérico; en cambio cuando la relación molar de Deaminasa a Isomerasa es de 1:1 (Expt 4) la actividad prácticamente va al doble y sensiblemente se altera el tipo isomérico de I a III. Con el doble de Isomerasa (Expt 5 sigue formándose predominantemente Uro III pero la actividad vuelve a los niveles iniciales de la Deaminasa y finalmente si el exceso de Isomerasa va en aumento (expts 6 al 10) ocurriría cierto tipo de inhibición de la actividad, hasta un máximo del 30% sin cambios en el tipo isomérico, es decir con un 100% de Uro III. Este fenómeno es realmente llamativo, pero no inesperado, pues ya teníamos algunas evidencias indirectas que la Isomerasa, en exceso, "in vitro", parecería ejercer una acción inhibitoria o tal vez "regulatoria" sobre la reacción; esto explicaría en parte el tan conocido efecto de activación que se produce cuando calentamos soluciones de PBGasa para obtener Deaminasa por destrucción de la Isomerasa. Sin embargo también parece, que dicha acción regulatoria tendría un máximo de expresión, como si se ejerciera sólo sobre ciertos sitios de la Deaminasa, distintos del sitio de contacto para formar el monómero activo y en un número limitado, por cuanto superado el exceso de Isomerasa en 4 veces, la actividad no desciende más. Reiteremos entonces que la relación óptima de Deaminasa a Isomerasa encontrada fué 1:1, expresada en moles de cada componente.

En conclusión, todo parece indicar que el monómero de la PBGasa sería entonces un complejo formado por una subunidad de Deaminasa y una subunidad de Isomerasa, correspondiéndole entonces un peso molecular de 25.000. En la Figura 10 proponemos un esquema para la formación de ese monómero, así como también en base a los datos conocidos de pesos moleculares de PBGasas de distinto origen, intentamos explicar la existencia de monómeros, dímeros y tetrámeros activos en diferentes tejidos.

De acuerdo con nuestro esquema, en algunos casos esa especie molecular mínima o monómero podría ser también la funcional, como tal vez fuera el caso de la PBGasa de callos. En otros tejidos la especie funcional más activa podría ser un dímero de este monómero de PBGasa, cuyo peso molecular sería entonces 50.000, como para la PBGasa de hígado bovino; o alternativamente es probable que ese dímero estuviera en equilibrio con su monómero, como parecería ocurrir con la PBGasa de Euglena gracilis. Y todavía podría ser que la PBGasa, en tejidos que poseen una actividad muy elevada de esta enzima, existiera en la forma de un tetrámero de peso molecular 100.000, tal como parece suceder con la PBGasa de eritrocitos de aves.

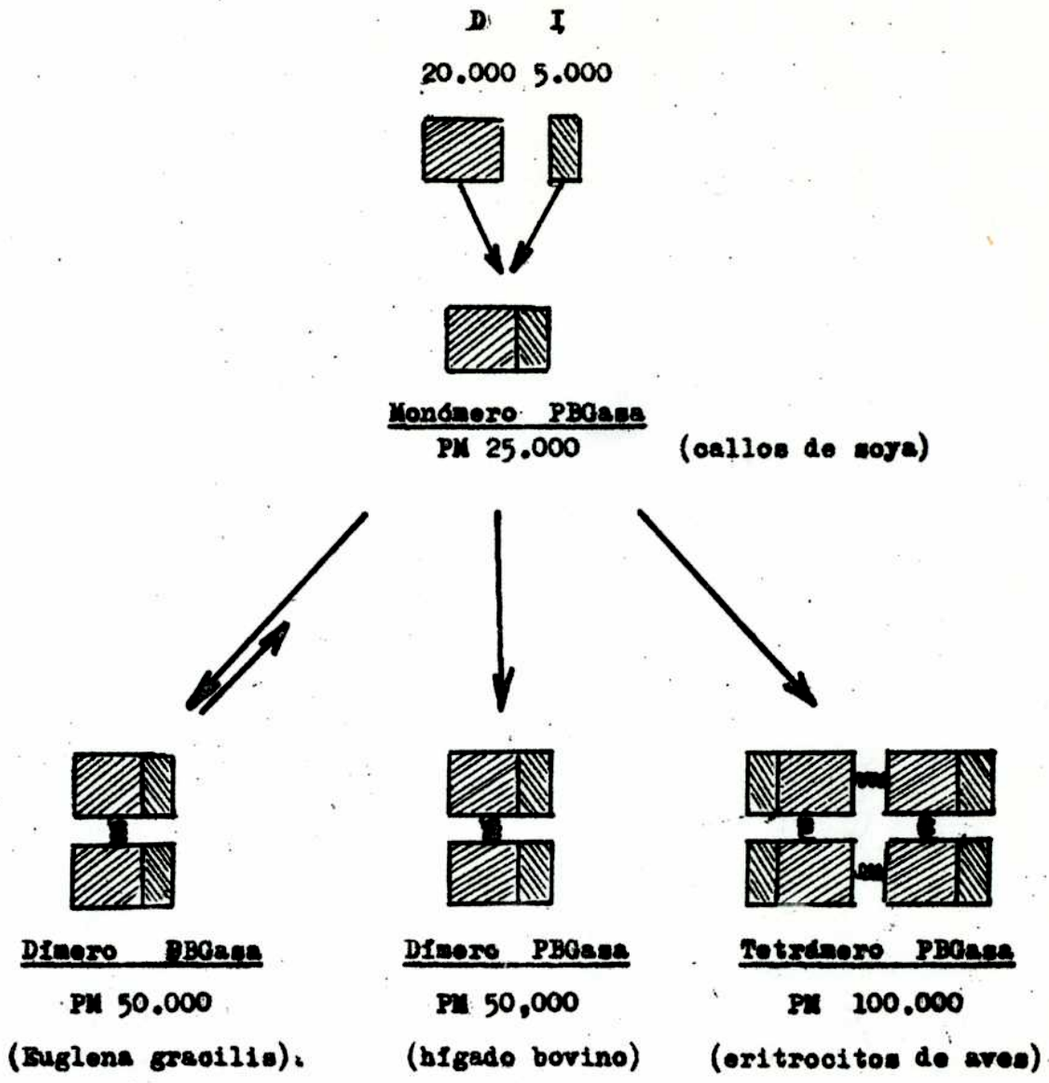


Figura 101: Esquema propuesto para la formación del monómero de la PBGasa y la posible existencia de monómeros, dímeros y tetrámeros activos en diferentes tejidos. D= Deaminasa (▨) I = Isomerasa (▩)

III.- INTERMEDIARIOS POLIPIRROLICOS EN LA CICLOTETRAMERIZACION ENZIMATICA DEL PBG.

III.- 1.- CONSIDERACIONES GENERALES:

Es importante enfatizar una vez más, que indudablemente una llave fundamental para la elucidación del mecanismo de acción de la PBGasa, es la identificación de etapas intermedias entre el PBG y los Uroporfirinógenos, en otras palabras la identificación de los intermediarios polipirrólicos.

Como fundamentamos claramente, la primera evidencia experimental de la existencia verdadera de estos supuestos, hasta entonces, intermediarios polipirrólicos provino de nuestro laboratorio, estudiando las enzimas de callos de soya (Llambías y Batlle, 1970, 1971a; Stella et al, 1971) se encontró que en condiciones normales de incubación, por la acción de la PBGasa por un lado y de la Deaminasa por otro, sobre el PBG, se formaban diferentes intermediarios pirrólicos; el resultante de la PBGasa, por reincubación con la enzima misma y PBG, producía sólo Uroporfirinógeno III, en tanto que el proveniente de la Deaminasa, prácticamente era Uroporfirinógeno I en su totalidad.

Recordemos que luego de este primer y fundamental hallazgo, la búsqueda y estudio de los intermediarios polipirrólicos, cobró rápidamente impulso. Es así que se reportó la acumulación y aislamiento de di y tetrapirroles, obtenidos enzimáticamente a partir de PBG, pero usando solamente la Deaminasa en presencia de conocidos inhibidores, (Pluscec y Bogorad, 1970, Radmer y Bogorad 1972; Davies y Neuberger, 1973). Podemos agregar, que hasta ahora con excepción del nuestro, ningún otro grupo ha detectado o aislado intermediario usando la PBGasa sin el empleo de inhibidores, y que los callos de soya eran también el único sistema, en el cual se había logrado obtenerlos en esas condiciones. Como acabamos de comentar, fué posible obtener intermediarios, no-isomerizados o anormales usando inhibidores nucleofílicos de la Deaminasa; sin embargo, nosotros consideramos, que este procedimiento no siempre es el más conveniente, puede darnos información útil; pero también es probable que las estructuras de los intermediarios aislados, obtenidos por inhibición de una reacción, no sean las que corresponden a los verdaderos intermediarios; y en este caso, Davies y Neuberger identificaron un intermediario que según sus datos era distinto al reportado por Bogorad y colaboradores, habiendo usado ambos grupos el mismo inhibidor y Deaminasa.

En consecuencia, uno de los objetivos fundamentales de este trabajo fué precisamente la búsqueda e investigación de los intermediarios polipirrólicos en PBGasa y Deaminasa de Euglena gracilis, en condiciones normales.

Teníamos asimismo interés en determinar si los inhibidores básicos ejercían efectos análogos sobre las enzimas de Euglena y si ese fuera el caso, poder comparar el comportamiento de los intermediarios obtenidos naturalmente o acumulados por inhibición de la reacción.

De los estudios preliminares a los cuales nos hemos ya referido en la parte I de resultados; teníamos suficientes evidencias como para sospechar que

las enzimas de Euglena eran otra fuente atrayente para el estudio de los intermediarios polipirrólicos. De la curva de actividad en función del tiempo, además de la insinuación de cierto lag para la formación de producto, la cantidad de porfirinas formado estaba muy por debajo de la relación estequiométrica; los gráficos de saturación de sustrato revelaban igualmente una llamativa diferencia en el comportamiento de la enzima, según se midiera producción de porfirinas o consumo de PBG, además de corroborar la falta de estequiometría; indudablemente tenía lugar mucho más gasto de sustrato del que era necesario para la cantidad de porfirinas que se estaban sintetizando. Nuestra experiencia nos aseguraba, que si bien podía plantear varias posibilidades para explicar estos resultados, que no vamos a discutir aquí, la más acertada era que, durante la conversión del PBG en Uroporfirinógenos, se estaban formando intermediarios polipirrólicos.

III.- 2.- EFECTO DE LOS IONES AMONIO Y DE LA HIDROXILAMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PBGasa DE PELLET.

Es bien conocida la acción del amonio y la hidroxilamina sobre el complejo y sus componentes, en general, según la concentración empleada, disminuye la formación de porfirinas, pero no el consumo del PBG, y actuando sobre la PBGasa, producen cambios en el tipo isomérico, habiéndose determinado que inhiben completamente la Isomerasa y no completamente a la Deaminasa (Sancovich et al 1969, 1970, 1977), es decir son compuestos interesantes como medio para acumular intermediarios artificialmente.

Se llevaron a cabo entonces experiencias para estudiar el efecto de estas bases sobre la PBGasa, empleándose como fuente de enzima la fracción pellet, las incubaciones se hicieron en aerobiosis y anaerobiosis a 2, 4 y 6 horas, y como los resultados fueron iguales o respondían al número patrón, en la Tabla XXX se ilustran los valores obtenidos en ausencia de aire.

Como suele ocurrir, la hidroxilamina fué en general relativamente un inhibidor más potente que el amonio; sobre todo a menores concentraciones, pero a diferencia del observado en la mayoría de los casos, la inhibición fué también significativa sobre el consumo del PBG, a veces (100 mM amonio o hidroxilamina) de igual orden, o aún mayor para 1 y 10 mM de amonio. Por otro lado, el tipo isomérico no se modificó espectacularmente. Por cromatografía en capa delgada se investigó la presencia de pirroles o polipirroles, frente a standards de PBG y un dipirrano sintético, pero a ninguna concentración con uno u otro reactivo, se encontraron evidencias claras de la presencia de polipirroles. De manera, que si bien estas bases poseen un efecto inhibitorio sobre la polimerización enzimática del PBG, su acción es aparentemente diferente, en este caso, no estamos en condiciones de explicar cuales serían esas diferencias y por otro lado, no son útiles como medio para forzar la acumulación de intermediarios, por lo cual decidimos concentrar nuestros esfuerzos en el estudio de la formación de polipirroles en condiciones normales, es decir en ausencia de todo agente extraño inhibidor o acelerador de la reacción.

Tabla XXX : Efecto de los iones amonio y de la hidroxilamina sobre la actividad de PBGasa de pellet

Reactivo agregado	Concentración final	Porfirinas formadas nmoles tot	Porfirinas formadas % inhibición	PBG consumido µg tot	PBG consumido % inhibición
Control	-----	1,22043	-----	19,085	-----
NH_4OH	100	0,43552	64,31	6,435	66,28
	10	0,92870	23,90	8,515	42,09
	1	1,22228	0	12,460	34,71
NH_2OH	200	0,00954	92,18	5,736	69,94
	100	0,39236	67,85	6,011	68,50
	10	0,66232	45,73	15,300	19,83
	1	0,79779	34,63	2,584	13,54

Las condiciones experimentales fueron las standard,excepto que, en algunos casos se agregó el reactivó a ensayar, en la concentración final indicada, y el tiempo de inacubación fué de sólo 2 horas.

III.- 3.- FORMACION ENZIMATICA DE INTERMEDIARIO.

III.- 3.- 1.- A partir de PBGasa de pellet:

Se había observado que cuando se incubaba pellet de Euglena gracilis, anaeróbicamente con PBG (Figura 102) hasta los 90-120 minutos la velocidad de formación de porfirinógenos era lenta; después de este periodo aumentaba en forma aproximadamente lineal con el tiempo, sin embargo debemos notar que esta linealidad dependía de varios factores, entre ellos, puede verse, que cuando se usaba la mitad de proteina de la misma preparación, la síntesis de porfirinógenos disminuía después de las 5 horas de incubación. Cuando se analizó la velocidad de consumo del sustrato, y este fué un hecho consistente, a los 20 minutos de incubación, aparentemente ya se había consumido casi el 90% del PBG, pero luego a la hora, se liberaba una buena cantidad de PBG a la solución, para luego aumentar su consumo hasta valores próximos a los de 40 minutos, variando poco entre los 90 y 240 minutos, a las 5 horas, de nuevo parecería como si nuevamente se liberara PBG a la solución. Esta sucesión de fenómenos es muy llamativa y aún no podemos ofrecer una explicación lógica, solo recordamos que un cuadro muy similar en cuanto al consumo del PBG, se observó con las mismas enzimas de callos de soya (Stella et al, 1971), de manera que debe encerrar un significado valioso, aunque todavía no hemos conseguido resolver este intrigante.

De acuerdo a todo lo discutido anteriormente estos datos sugerían fuertemente que la PBGasa de Euglena era capaz de formar y acumular intermediarios polipirrólicos.

Nuestras suposiciones se confirmaron rapidamente cuando se analizó la composición de todas las mezclas de incubación por cromatografía en papel y capa delgada. Después de la incubación se agregó TCA 25% como de costumbre para precipitar la proteina separada por centrifugación y el sobrenadante se neutralizó inmediatamente con HO Na 5N, de allí se tomaron muestras para la medición de PBG, porfirinas y cromatografía en papel, capa delgada y Sephadex G-25.

En la Figura 103, se ilustra corrida correspondiente con los datos y condiciones de la Figura 102. Se observa que a todos los tiempos de incubación se detectó una mancha fusiforme de un color rojo oscuro, (PBG produce un color rojo magenta) que se movía un poco más lentamente que la Uroporfirina III, pero más rápidamente que el PBG y el dipirrometano sintético testigos. Consideramos que ese compuesto pirrólico, que llamaremos P-intermediario o P-pirrol tiene por lo menos una o las dos posiciones α libres, es un polipirrilmetano. El P-intermediario reaccionó con el reactivo de Ehrlich más rápidamente que el PBG pero su color también desapareció antes que el del monopirrol. En aquellos tiempos a los cuales el consumo de PBG fué mayor, no se detectó su presencia, sin embargo a los 60, 300, 360 minutos, además del P-pirrol, se reveló claramente que una mancha de PBG y trazas a 120 y 240 minutos. Pero en ningún caso se encontraron más que estos dos compuestos que daba la reacción de Ehrlich pero estos resultados solos no pueden excluir la posibilidad de que el P-intermediario fuera una mezcla de polipirroles de diferente longitud y el hecho de que estuvieran presentes a todos los tiempos de incubación, además de intere-

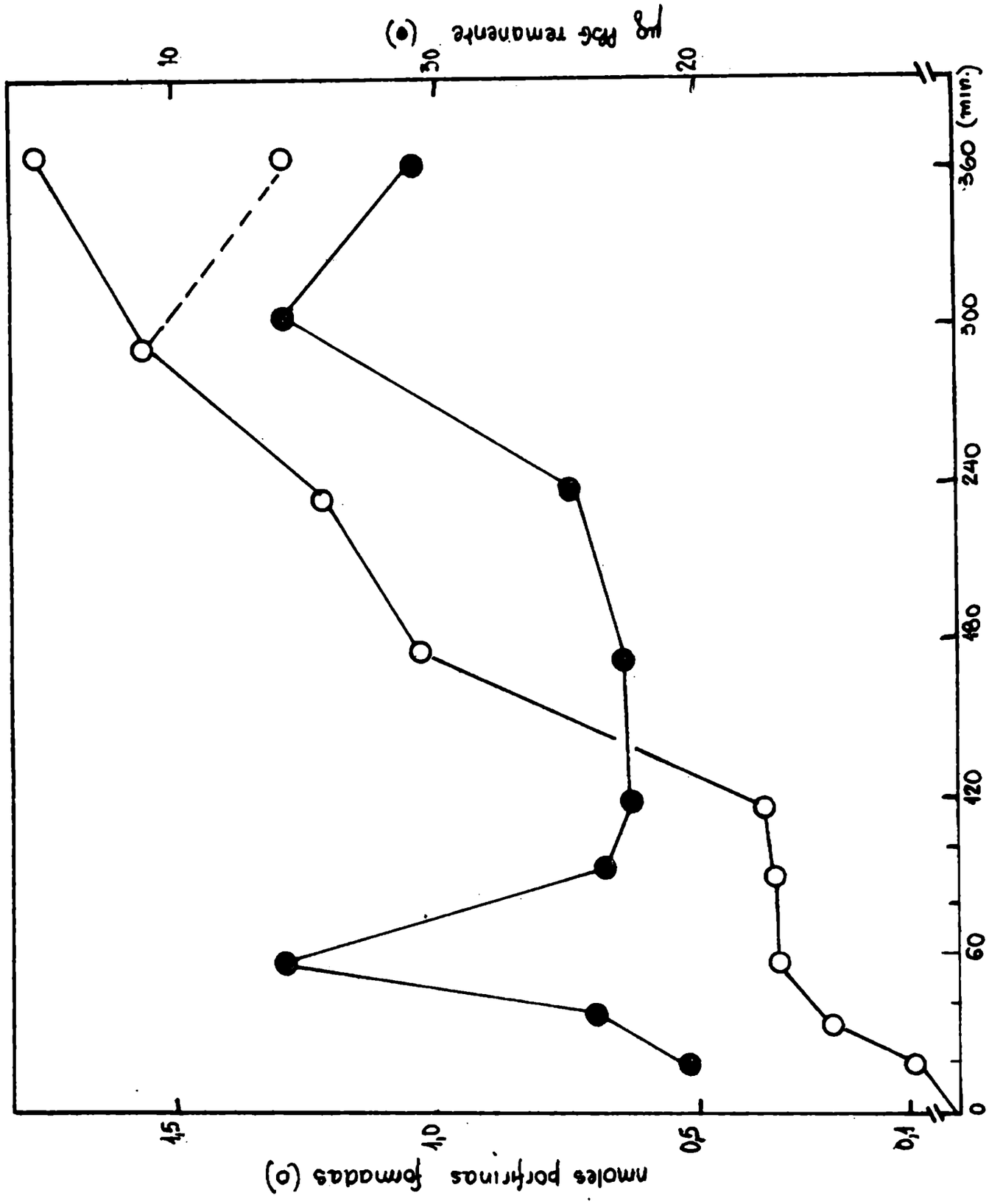


Figura 102: Velocidad de formación de porfirinas (o) y consumo de PBG (expresado como PBG remanente) (•), cuando se incubó PBGasa de pellet de *Euglena gracilis*, (2 ml, 14 mg) (o 2 ml, 7 mg) con PBG (20 µg/ml), en condiciones standard.

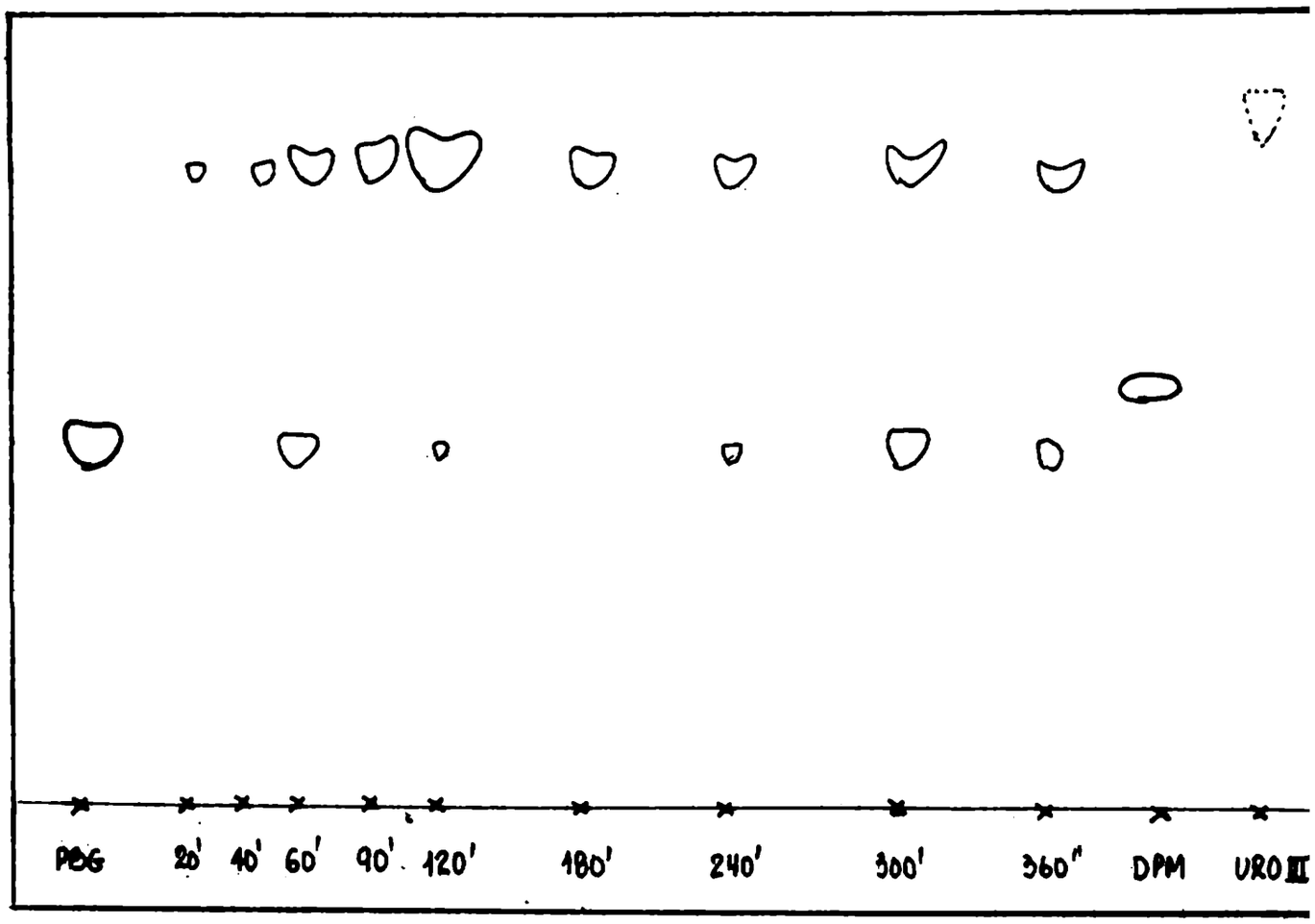


Figura 103: Cromatografía en capa delgada de los componentes presentes en los sobrenadantes correspondientes a distintos tiempos de incubación de PBGasa de pellet con PBG (según las condiciones indicadas en la Figura 102), revelados con el Reactivo de Ehrlich. Se corrieron standard de PBG, un dipirrilmetano sintético (DPM) y Uro II (La Uroporfirina se reveló por fluorescencia). Las demás condiciones experimentales se describen en Métodos.

sante, nos inclinó a considerar esta última probabilidad como la más atractiva.

En la Figura 104 se muestra un perfil de elución de una muestra de P-sobrenadante, a través de una columna de Sephadex G-25, en cada eluato se hizo la reacción de Ehrlich, por la diferente velocidad de desarrollo y estabilidad del color producido por el P-pirrol (que tiene además un máximo a 495 nm) y el PBG (A max = 555 nm) es fácil distinguir uno de otro; además la columna había sido calibrada con PBG, un dipirrilmetano sintético y Uroporfirina III. Se encontró así que el P-pirrol eluía prácticamente dentro de la zona de la Uroporfirina y de la mezcla, también se separaba el PBG remanente, cuyo pico coincidía con el volumen de elución determinado para el PBG standard.

En consecuencia, habíamos hallado hasta aquí, que el comportamiento de la PBGasa de Euglena gracilis, era parecido al de la enzima de callos, pero algo más complejo. Sin duda alguna, era capaz de formar intermediarios a una velocidad tal, que nos permitía detectarlos en condiciones normales. Sin embargo, también estaban presentes a tiempos de incubación prolongados, aunque parecería que su máxima concentración ocurriría a los 120 minutos. En cuanto a la composición isomérica de los porfirinógenos formados, en general el 70% o más correspondía al tipo III, aunque la relación podía variar de batch a batch.

III.- 3.- 2.- A partir de Deaminasa:

Incubando anaeróbicamente una preparación de Deaminasa parcialmente purificada con PBG (Figura 105) y analizando los Uroporfirinógenos formados (30% tipo I) y el consumo de PBG, se encontró que los perfiles eran muy parecidos a los obtenidos con pellet, excepto que la primera fase lenta de síntesis de porfirinógenos era de 90 minutos, al cabo de los cuales como antes, los productos aumentaban con el tiempo más rápidamente. Es notable que la Deaminasa de callos de soya, también tenía un lag menor que el de la PBGasa de la misma fuente. El consumo de PBG seguía un modelo similar, excepto que la primera y mayor liberación de sustrato ocurría a los 40 minutos.

Luego de la incubación, el análisis por cromatografía en capa delgada (Figura 106) reveló la presencia de PBG a todos los tiempos, confirmando su máximo a los 40 minutos y mostró, de nuevo también, en todas las muestras la presencia de otro compuesto distinto del PBG, que también daba reacción de Ehrlich positiva, que nosotros designamos como el D-pirrol, en mayor concentración a los 90 minutos, con características similares a las del P-pirrol, menos fusiforme que este último es decir ligeramente diferente en forma, rojo profundo, con un Rf mayor que el del PBG y Dipirrolmetano pero menor que el P-pirrol. También desarrollaba el color más rápidamente que el PBG, pero luego era menos estable. Cuando se cromatografiaban mezclas de cantidades aproximadamente iguales de P y D-intermediarios, se resolvieron claramente en dos manchas con los Rf correspondientes a los P y D-pirroles respectivamente.

El sobrenadanete conteniendo el D-intermediario mostró un comportamiento también análogo al P-intermediario cuando se cromatografió por Sephadex G-25 (Figura 107). Tampoco se visualizó en este caso, ninguna evidencia de otra especie

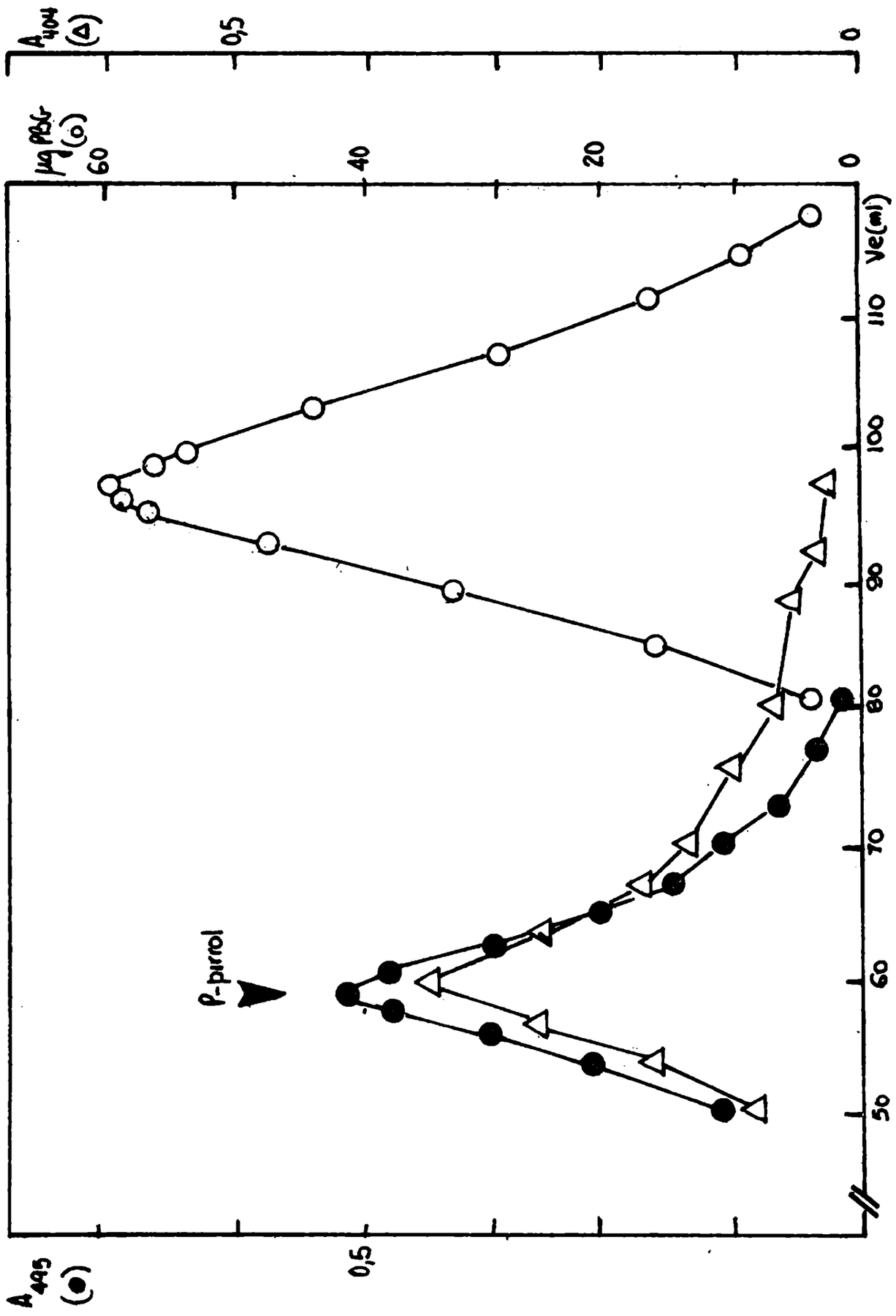


Figura 104: Cromatografía del sobrenadante conteniendo el P-pirrol, en columna de Sephadex G-25 mediano (calibrada) equilibrada y eluida en buffer de fosfato (1,2 cl ancho , 100 cm altura, Ve = 105 ml, Vo = 45 ml), P-pirrol (●); PBG (o), Uroporfirina III (corrida separadamente) (Δ)

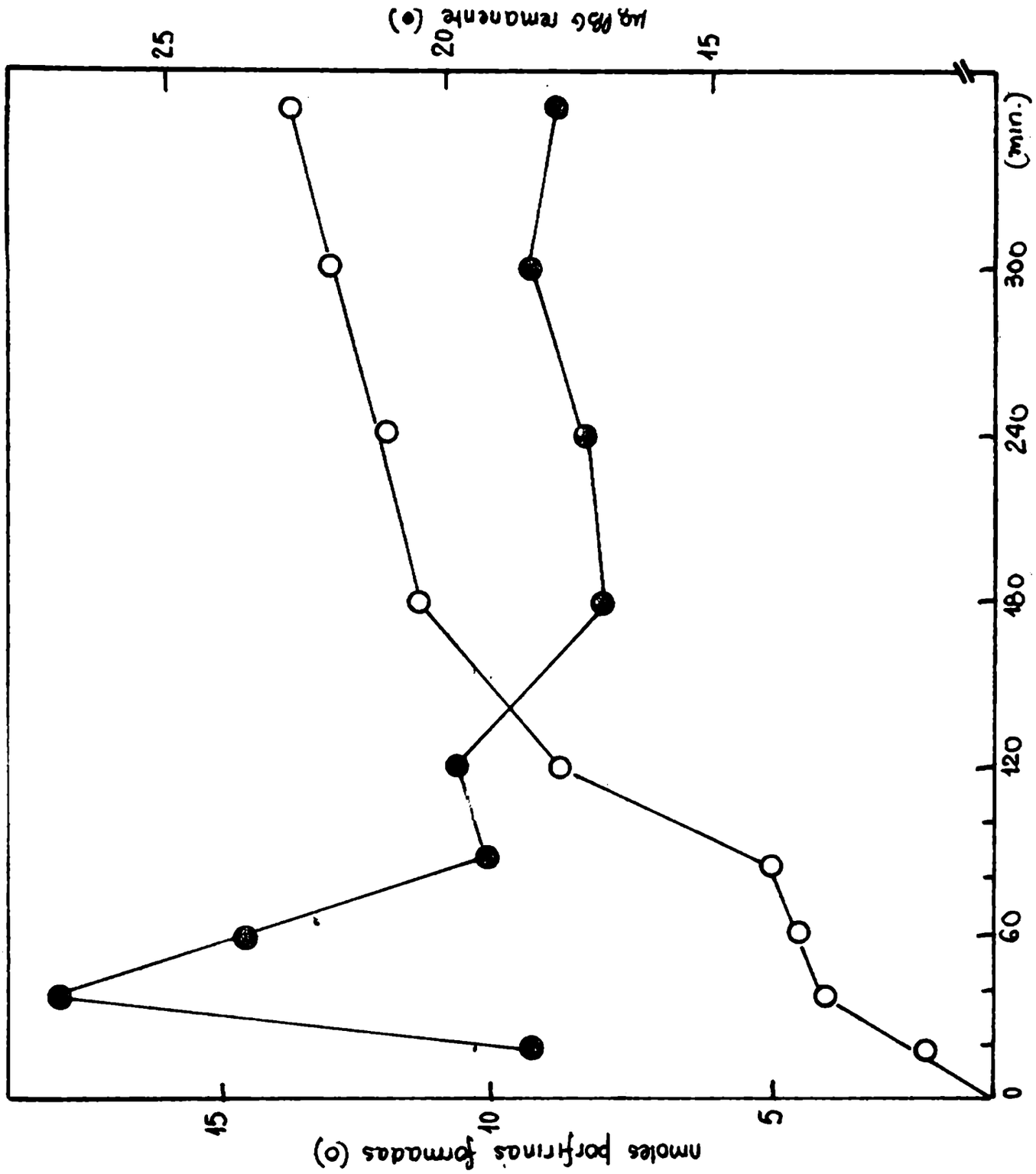


Figura 10: Velocidad de formación de porfirinas (o) y consumo de PBG (• PBG remanente) (•), cuando se incubó Deaminasa de *Euglena gracilis* (proveniente de la etapa 4 de purificación sin tratamiento ácido) (2 ml, 7 mg) con PBG 20 ug/ml), en condiciones standard.

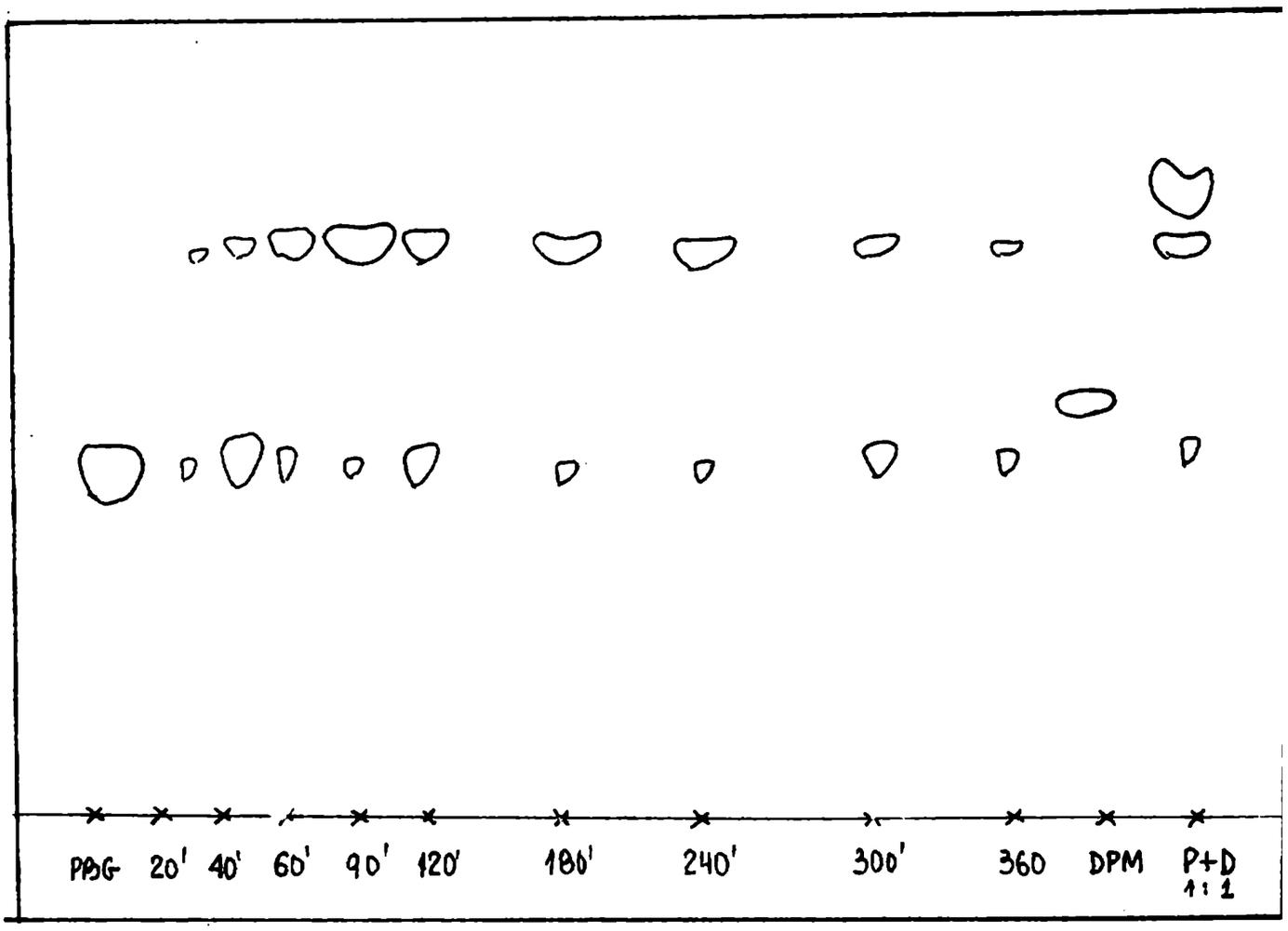


Figura 106: Cromatografía en capa delgada de los componentes presentes en los sobrenadantes correspondientes a distintos tiempos de incubación de Deaminasa con PBG (según Figura 105). El resto de las condiciones son las descriptas para la Figura 103). La relación P a D, de 1:1, se calculó, tomando arbitrariamente como unidad el valor de la absorción de la reacción de Ehrlich a los 495 um, usando volúmenes tales como para que la mezcla contuviera una concentración de P y D iguales.

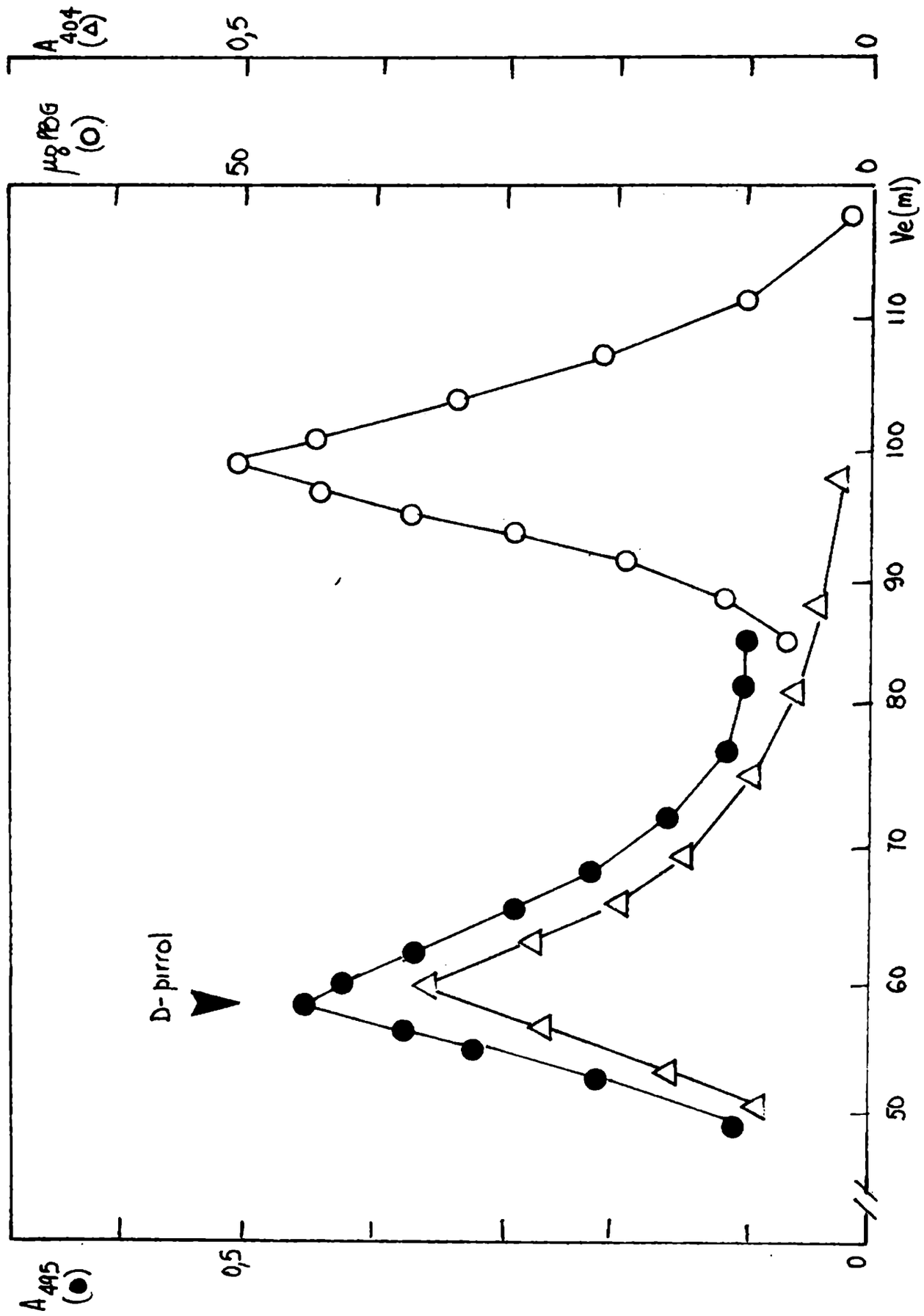


Figura 107: Cromatografía del sobrenadante conteniendo el D-pirrol (obtenido a los 90 minutos), en columna de Sephadex G-25 mediano. Las condiciones son las mismas que las descriptas para la Figura 104. (●) D-Pirrol ; (o) PBG; ( ) Uroporfirina III (corrida separadamente)

que diera reacción de Ehrlich positiva en el D-intermediario.

Si bien P y D-pirrol presentaron varias características comunes, los resultados obtenidos estaban indicando que el intermediario pirrólico producido por la PBGasa de pellet actuando sobre el PBG, es diferente del producido por la Deaminasa.

III.- 4.- UTILIZACION ENZIMATICA DE LOS INTERMEDIARIOS.

Con el objeto de investigar la naturaleza y el comportamiento de estos intermediarios producidos por las enzimas de Euglena gracilis, se llevaron a cabo una serie de experiencias en las cuales los P y D-polipirroles formados enzimáticamente se incubaron con PBGasa de pellet o Deaminasa y con o sin PBG según se indica en las Tablas XXXV y XXXVI.

De los resultados obtenidos con el P-pirrol (Tabla XXXV) observamos que cuando éste se incuba con pellet y PBG, se inhibe significativamente la síntesis total de porfirinógenos, sin modificarse seriamente la distribución isomérica.

Cuando el P-intermediario se incubó con la PBGasa de pellet y ^{14}C-PBG se apreció además de una menor síntesis, una disminución de la actividad específica de los porfirinógenos formados, sugiriendo ésto que el P-sobrenadante debía contener un intermediario, que en cierto grado, se había incorporado en los tetrapirroles cíclicos.Esta incorporación del P-polipirrol fué confirmada además, usando ^{14}C-P-intermediario y PBG frío, en este caso se detectó radio actividad en los porfirinógenos sintetizados. Como era de esperarse, hubo una formación enzimática de porfirinas muy baja, a expensas del intermediario y la enzima ya fuera usando pellet o Deaminasa.

Debemos quizás, aquí recordar y enfatizar que en todos los ensayos se llevan a cabo siempre experimentos de control, en todas las combinaciones necesarias para tener en cuenta la formación química de porfirinógenos y en cada caso, se han descontado ya sea la cantidad de productos formados o de marca incorporada proveniente de estos controles. Por ejemplo, cuando las mezclas contenían intermediarios bio-sintéticos, se hicieron blancos a tiempo 0 y t, conteniendo enzima más intermediario, o intermediario más PBG sin enzima, completando los sistemas al final de la incubación, deduciendo las correspondientes cantidades de porfirinas formadas no enzimáticamente. También se efectuaron correcciones por la cantidad de PBG presente en la solución de los intermediarios.

Cuando se efectuó el mismo conjunto de incubaciones usando como enzima a la Deaminasa, nuevamente el P-pirrol inhibió cerca del 40% la síntesis de porfirinógenos, aumentando ligeramente la proporción del isómero III, sugiriendo ésto que habría tenido lugar también cierta incorporación del polipirrol presente en el sobrenadante; estas suposiciones encontraron mayor apoyo cuando se hicieron las experiencias de marcación directa, empleando el ^{14}C-P-intermediario y de dilución isotópica con ^{14}C-PBG y el P-polipirrol frío.

Tabla XXXV : Incorporación enzimática del P-polipirrol en Porifrinógenos

Condiciones experimentales					Porfirinógenos formados					
	Sobrenad	PBG	Pellet	D	nmoles	activid (%)	cpm	actividad específ.	Tipo I	isómerico(III
1.	-	+	+	-	1,1603	100	---	---	40	60
2.	P	+	+	-	0,1960	17	---	---	40	60
3.	P(^{14}C)	+	+	-	0,3240	28	95	293	40	60
4.	-	+(^{14}C)	+	-	0,8211	100	1219	1484	30	70
5.	P	+(^{14}C)	+	-	0,1095	13	103	944	---	---
6.	P	-	+	-	0,0873	---	---	---	---	---
7.	P(^{14}C)	-	+	-	0,2079	---	---	---	---	---
8.	-	+	-	+	6,2716	100	---	---	80	20
9.	P	+	-	+	2,5476	41	---	---	82	18
10.	P(^{14}C)	+	-	+	2,7368	44	252	92	75	25
11.	-	+(^{14}C)	-	+	4,4186	100	3107	703	92	8
12.	P	+(^{14}C)	-	+	1,8538	42	1015	547	85	15
13.	P	-	-	+	0,0660	---	---	---	---	---
14.	P(^{14}C)	-	-	+	0,0888	---	---	---	---	---

El P ó P(^{14}C)-intermediario se preparó incubando 20 ml de pellet (4,31 mg/ml) en buffer fosfato pH 7,4 y 600 µg de PBG (ó ^{14}C-PBG) en 2 ml (88.950 cpm/ml) durante 120 minutos, anaeróbicamente, en la oscuridad a 38 °C, en un volumen final de 22 ml. Después de la incubación se precipitó la proteína con TCA y se separó por centrifugación. El sobrenadante (Sobrenad) conteniendo el P ó P(^{14}C)-intermediario pirrólico, se neutralizó inmediatamente. En este sobrenadante se determinaron, porfirinas totales, PBG remanente y radioactividad. Las mezclas de incubación contenían según se indique: Pellet (15,35 mg prot/ml) ó Deaminasa (D)(5,60 mg prot/ml) en buffer fosfato; PBG ó ^{14}C-PBG(60 ug en 0,2 ml)(17790cpm) y P ó P(^{14}C)-sobrenadante (0,8ml; 4,242 cpm). El volumen total fué de 3 ml. El resto de las condiciones experimentales son las standard.

Tabla XXXVI : Incorporación enzimática del D-pirrol en Porfirinógenos

Condiciones experimentales					Porfirinógenos formados					
	Sobrenad.	PBG	Pellet	D	nmoles	activ (%)	cpm	actividad específ.	Tipo isómerico% I	III
1.	-	+	+	-	1,6464	100	---	---	40	60
2.	D	+	+	-	0,7013	42	---	---	80	20
3.	D(^{14}C)	+	+	-	0,5242	32	180	343	54	46
4.	-	+(^{14}C)	+	-	1,0779	100	607	593	28	72
5.	D	+(^{14}C)	+	-	0,3504	20	---	---	57	43
6.	D	-	+	-	0	---	---	---	---	---
7.	D(^{14}C)	-	+	-	0,0144	---	---	---	---	---
8.	-	+	-	+	2,9328	100	---	---	82	18
9.	D	+	-	+	0,5698	20	---	---	80	20
10.	D(^{14}C)	+	-	+	0,6498	22	607	1026	86	14
11.	-	+(^{14}C)	-	+	2,7736	100	2157	777	90	10
12.	D	-	-	+	1,2071	43	513	424	95	5
13.	D	-	-	+	0,0709	---	---	---	---	---
14.	D(^{14}C)	-	-	+						

El D ó D(^{14}C)-intermediario se preparó incubando 15 ml de Deaminasa (D)(0,98 mg/ml) en buffer fosfato a pH 7,4, y 60 µg de PBG ó ^{14}C-PBG, en 1,5 ml(88558 cpm/ml) durante 90 minutos, anaeróbicamente, en la oscuridad, a 38°C, en un volumen final de 16,5 ml. Después de la incubación el D ó D(^{14}C)-sobrenadante se obtuvo como se indicó para el P-intermediario en la Tabla XXXV. Las mezclas de incubación contenían: Pellet (13,45 mg prot/ml ó Deaminasa (1,817 mg prot/ml/ según se indique, en buffer (2ml); cuando presentes el PBG ó ^{14}C-PBG (60 µg en 0,2 ml (17718 cpm) y D ó D(^{14}C)sobrenadante (0,8 ml)(4257 cpm). El volumen total: 3ml. El resto de las condiciones experimentales fueron las standard descriptas en Métodos.

De los datos de la Tabla XXXVI, podemos ver que usando el D-pirrol se obtuvieron un tipo similar de resultados, excepto que la inhibición del sistema total cuando se incubó junto con PBG fué mayor, y el porcentaje de isómeros de tipo I aumentó. La marcación del D-intermediario se incorporó en los porfirinógenos pero no se comportó ni como sustrato ni como intermediario cuando se incubó con pellet o con Deaminasa en ausencia de PBG. Cuando el D-pirrol se incubó con Deaminasa y PBG inhibió la síntesis total de producto, aumento aún más la serie I y tanto por el método de marcación directa como por dilución isotópica se encontró que el D-intermediario se incorporaba específicamente en el Uroporfirinógeno I.

Estos resultados indicaban, que la naturaleza de los intermediarios presentes en los P y D-sobrenadantes de preparaciones de Euglena gracilis eran diferentes de aquellos producidos por las enzimas de callos de soya. También era evidente, que los P y D-intermediarios de Euglena no eran iguales, parecía probable que la estructura del polipirrilmetano formado por la Deaminasa correspondiera a un polipirrol no isomerizado. Los datos de incorporación por un lado y de inhibición por otro, sugerían que el polipirrol así agregado no actuaba como un verdadero sustrato de la reacción sino como un intermediario, también mostraban que este polipirrol estaba compitiendo de alguna forma con el PBG, indicando que la enzima tendría mayor afinidad por su sustrato natural que por el polipirrol añadido externamente y en consecuencia, era de esperar que la incorporación de este último fuera bajo.

Era probable también que tanto en el P como en el D-sobrenadante, hubiera diferentes especies polipirrólicas, que según la longitud de la cadena abierta de los polipirroles, se incorporarían enzimáticamente en los porfirinógenos en un grado diferente.

Los recientes hallazgos que demostraban que los tripirranos tenían un fuerte efecto inhibitorio sobre la formación de porfirinógenos (Frydman et al, 1974) sumados a los resultados de las cromatografías en placa y en Sephadex con los P y D-pirroles de Euglena y la modificación del tipo isomérico con incremento de III o I según se empleara el P o D-pirrol, apoyaban nuestra primitiva hipótesis de que en presencia de Deaminasa e Isomerasa (Llambías y Batlle, 1971a,b), se deben formar intermediarios normales isomerizados, desde el comienzo de la polimerización del PBG, mientras que por acción de la Deaminasa sola, se sintetizarían polipirroles no isomerizados o anormales; sin embargo, si bien los resultados con las enzimas de Euglena como dijimos, apoyan estas ideas, habría ahora un pequeño aspecto que no está del todo seguro todavía, y es que la isomerización ocurra realmente desde el inicio mismo de la reacción; agregaríamos que hasta esta altura de las experiencias, todo parecería indicar entonces que los sobrenadantes P y D de Euglena gracilis deben contener un alto porcentaje de intermediarios más largos, quizás tetrapirrilmetanos, que competían muy desfavorablemente con los intermediarios unidos a la enzima cuando se agregaban al estado libre a la mezcla de reacción, inhibiendo finalmente la producci de porfirinógenos; de ser ésto así, su incorporación tendría que ser además, ne-

cesariamente baja, estando también de acuerdo con los resultados experimentales obtenidos.

III.- 5.- UTILIZACION ENZIMATICA DE LOS INTERMEDIARIOS LIBRES.

Si la hipótesis postulada fuera correcta, debería esperarse que el agregado de cantidades crecientes de los polímeros P y D libres, a las enzimas inhibiera en forma correspondientemente creciente la formación de porfirinógenos y también debería tener efecto sobre la composición isomérica. De manera que, se planearon una serie de experiencias para comprobar nuestra teoria, cuyos detalles y resultados se muestran en la Figura 108. Vemos aquí, que el agregado del P-sobrenadante a un sistema enzimático que formaba 60% de tipo III y 40% de tipo I (parte superior-A) tenía una significativa influencia sobre la actividad, tanto como sobre la síntesis total de porfirinógenos como sobre el consumo de PBG. También encontramos que el porcentaje de Uro I aumentaba mientras que al mismo tiempo ocurría una correspondiente disminución en la cantidad de tipo III. Como esperábamos, se observó un efecto reverso con la Deaminasa (Figura 108-B).

Si ahora analizamos qué sucedió cuando se estudió la acción del D-sobrenadanete sobre estas mismas enzimas (Figura 109), se observó que el D-polipirrol inhibía fuertemente la formación de porfirinas y consumo de sustrato por pellet (Figura 109-A) y análogamente cantidades crecientes del D-intermediario inhibieron significativamente la formación total de porfirinógenos por la Deaminasa (Figura 109-B). La composición isomérica del sistema que producía tanto tipo III como I se modificó según lo anticipado, lo que no es fácil de entender, en cambio fué el ligero aumento de tipo III cuando usábamos una enzima que sólo debía formar Uroporfirinógeno I.

Los resultados ilustrados en las Figuras 108-A y 109-A en cierto modo se parecen a los encontrados por Frydman et al (1976), cuando estudiaron la influencia de dos tripirranos sintéticos diferentes sobre la PBGasa de gérmen de trigo. Ellos hallaron, que esos tripirranos tenían un marcado efecto sobre la formación de porfirinas y la distribución isomérica (no determinaron consumo de sustrato) ejerciendo una fuerte inhibición sobre la síntesis de Uroporfirinógeno III, y consecuentemente ocurría un neto aumento sobre el porcentaje de Uroporfirinógeno I, una acción reminiscente, pero bastante mayor que la observada por estos mismos autores (Frydman et al, 1973), usando dipirrilmetanos sintéticos.

¿Qué nos estaban sugiriendo entonces nuestros hallazgos? Si bien no conocemos cuáles son las concentraciones reales de los polipirroles aquí usados, es evidente, de todos modos que el grado de inhibición es mayor que el producido por los tripirranos sintéticos, sugiriéndonos como ya lo veníamos sospechando, que podríamos estar en presencia de tetraprirrilmetanos; recordemos que, cuanto más largo es el intermediario, menor es su incorporación en una reacción de polimerización secuencial que ocurra sobre una superficie enzimática y en consecuencia mayor es su inhibición.

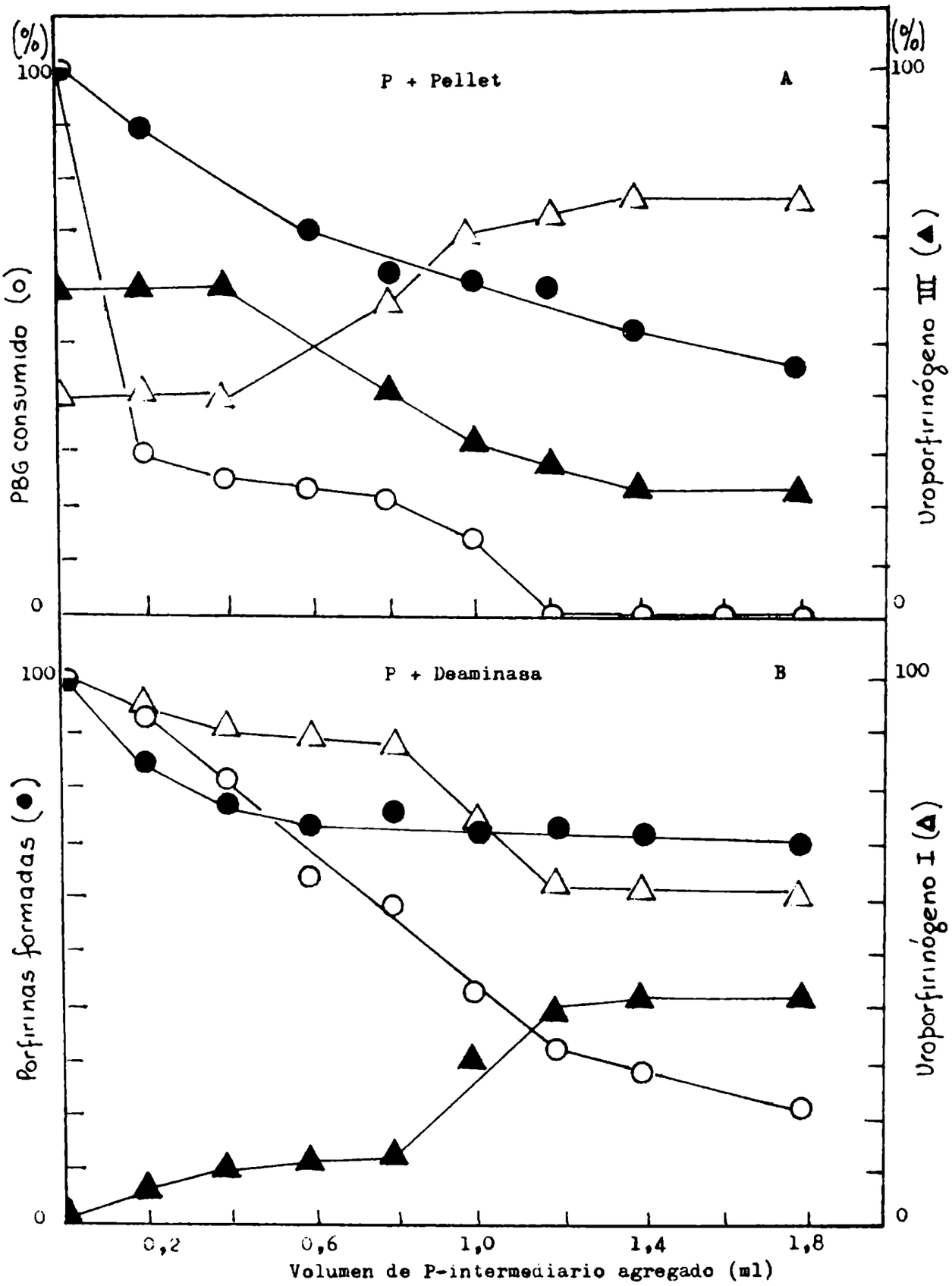


Figura 108: Efecto del P-polipirrol libre sobre la formación enzimática de porfirinógenos y su distribución isomérica. El P-intermediario (P-int) se preparó incubando 20 ml de pellet (4,77 mg prot/ml) en buffer de fosfato, y 600 µg de PBG en un volumen final de 22 ml, durante 120 minutos, anaeróbicamente, en la oscuridad. Después de la incubación, se agregó TCA para precipitar la proteina, separada por centrifugación. El sobrenadante se neutralizó inmediatamente y contenía el intermediario polipirrólico P. En este sobrenadante se determinaron porfirinas formadas y PBG consumido. Las mezclas de incubación contenían: pellet (A) (1,035 mg prot por ml) o Deaminasa (B) (2,967 mg/ml); PBG (60 µg en 0,2 ml) y los volúmenes indicados del sobrenadante P, en un volumen final de 4 ml. El tiempo de incubación fue de 4 horas. La composición isomérica se expresa como porcentaje de la cantidad total de porfirinas formadas en cada caso

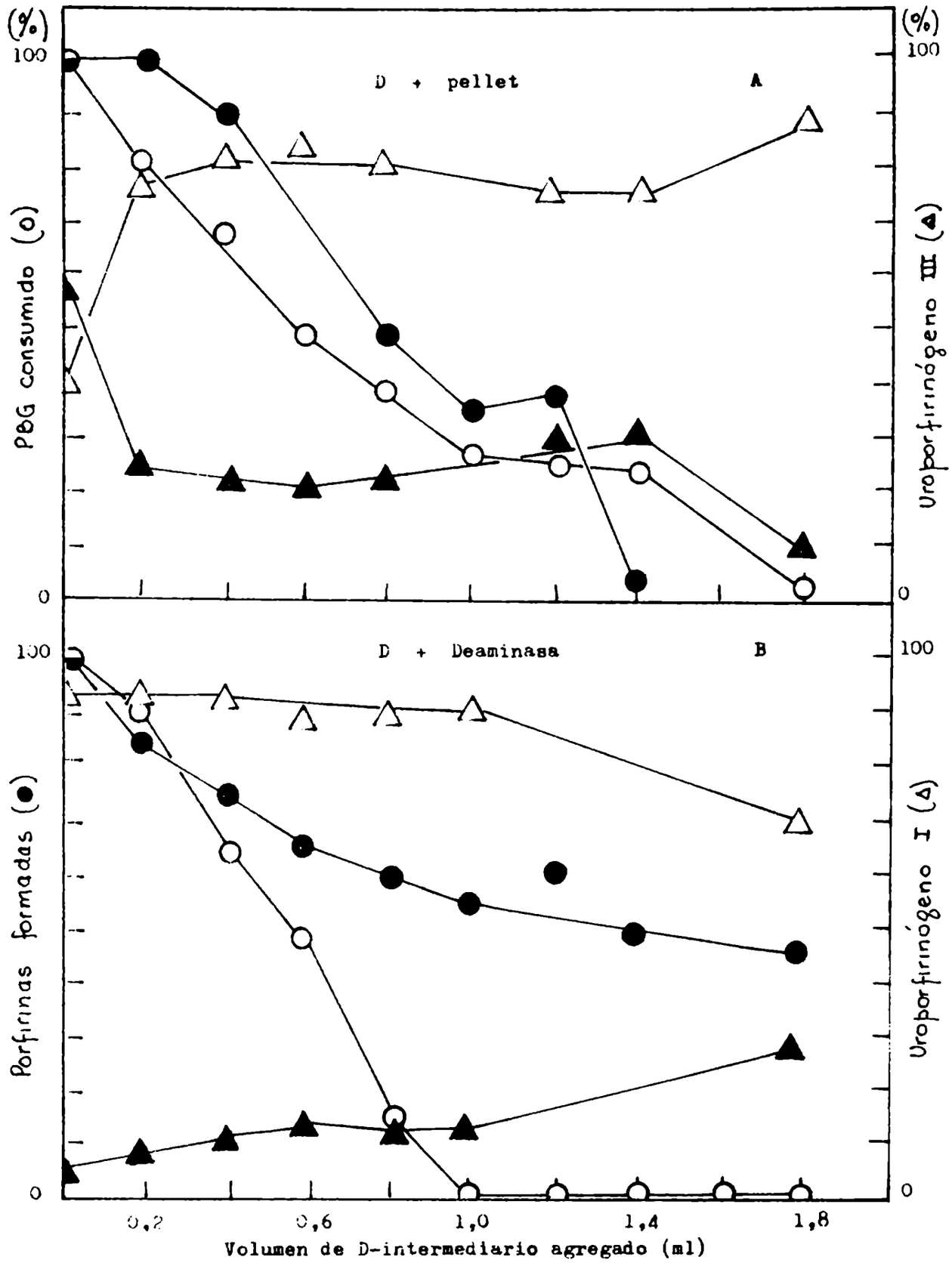


Figura 109: Efecto del D-polipirrol libre sobre la formación enzimática de porfirinógenos y su distribución isomérica. El D-intermediario (D-int) se preparó incubando 18 ml de Deaminasa (0,983 mg proteina/ml) en buffer de fosfato y 600 µg de PBG en 2 ml, durante 90 minutos, anaeróbicamente, en la oscuridad, en un volumen final de 20 ml. Después de la incubación, el D-polipirrol se obtuvo como se describió para el p-popilirrol en la Figura 108. Las mezclas de incubación contenían: pellet (A) (1,035 mg/ml) o Deaminasa (B) (0,983 mg/ml), PBG , 60 µg (en 0,2 ml) y los volúmenes indicados de sobrenadante D, en un volumen final de 4 ml. La composición isomérica se expresa como se indicó en la Figura 108.

Además, notemos que según estos resultados, es también bien claro que los P y D-intermediarios ejercen una inhibición más fuerte sobre sus propias enzimas, pellet y Deaminasa, que sobre Deaminasa y pellet respectivamente, indicando que sus soluciones deben contener un gran porcentaje de polipirrilmetano de cadena más larga, que se une selectivamente a su enzima compitiendo con el PBG y/o el polipirrilmetano natural unido a la enzima, por el mismo sitio de unión. En consecuencia, es altamente probable, que la estructura del polipirrol formado por la PBGasa de Euglena gracilis corresponda a la de un tertapirrilmetano normal isomerizado en tanto que, el D-sobrenadante parecería contener un polipirrol anormal desde el punto de vista de una biosíntesis fisiológica, posiblemente un tetrapirrilmetano no isomerizado, como el descripto por Radmer y Bogorad (1972).

II.- 6.- UTILIZACION ENZIMATICA DE LOS POLIPIRRILMETANOS NATURALES, UNIDOS A LA ENZIMA.

Si la polimerización enzimática del PBG tiene lugar en una secuencia "non-stop" sobre la superficie de la enzima, como ya lo postulamos, los posibles intermediarios deben permanecer unidos a las enzimas hasta que la cadena alcence su longitud crítica y esté lista para su ciclización. Con el objeto de obtener mayor apoyo experimental para esta hipótesis, se decidió estudiar la interacción con las enzimas de los polipirroles naturales P y D formados por la PBGasa y la Deaminasa de Euglena gracilis pero, sin liberarlas de sus enzimas.

Teníamos evidencias de que existía una asociación bastante estable intermediario-enzima. Así, cuando el polipirrol P o D supuestamente unido a la enzima se cromatografiaba en capa delgada (Figuras 110 y 111), mientras que el P o el D-intermediario libre o sus mezclas, corrían como ya habíamos visto (Figuras 103 y 106) con Rf_s mayores que el del PBG, revelando con reactivo de Ehrlich; las muestras conteniendo el P-enzima (Figura 110A) o el D-enzima (Figura 110B), quedaban en la línea de base, produciendo una coloración rojiza o rojo-amarronada, en tanto que las respectivas enzimas solas no daban reacción característica de Ehrlich, pero el revelado con ninhidrina (Figuras 110B y 111B) confirmaba que no se habían desplazado de la línea de siembra. Por otro lado, si se aplicaba una muestra conteniendo la enzima aislada y el P o D-pirrol libre (P + E o D + E), analizando los resultados del revelado con Ehrlich o con ninhidrina, se encontraba que la enzima, como en los casos anteriores, permanecía en la línea de base, en tanto que el pirrol corría hasta la posición correspondiente al pirrol libre. En consecuencia, podíamos suponer que existiría una forma estable de un complejo intermediario-enzima, pero que una vez separados ambos componentes no volvían o no podían volver a asociarse de la misma manera.

Otra prueba de la existencia de que por lo menos en las condiciones de estudio, el intermediario estaría unido a la enzima, se obtuvo cromatografiando en una columna de Sephadex G-25 mediano, muestras sin desproteinizar de los incubados conteniendo los P y D- intermediarios marcados con ^{14}C. En las Figuras 112 y 113 se muestran los resultados obtenidos y se dan además los detalles experimentales.

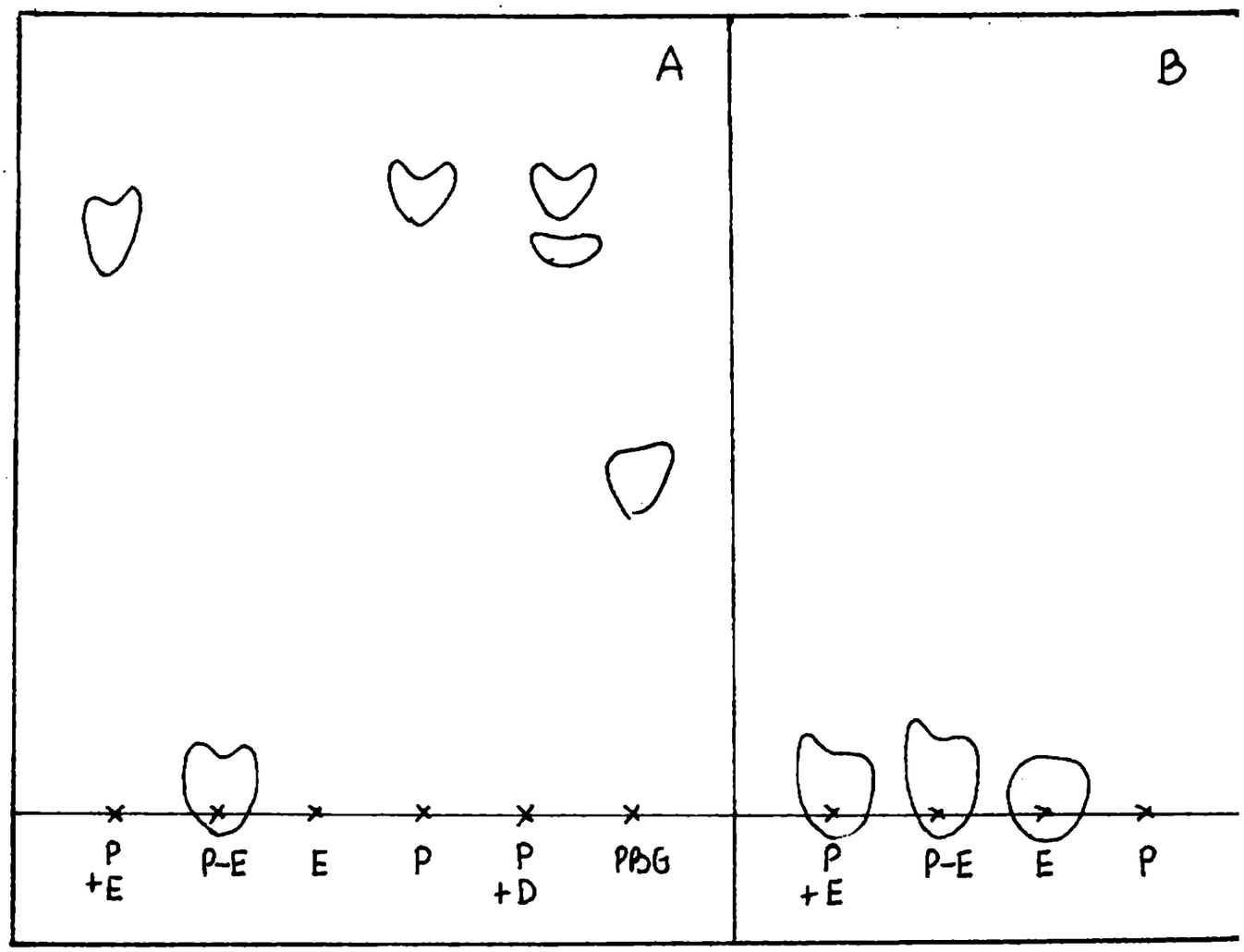


Figura 110: Cromatografía en capa delgada del P-pirrol unido a la enzima (P-E), de una mezcla de P-pirrol libre y enzima libre (P + E), y muestras de P-pirrol libre (P), enzima libre (E), mezclas de P y D-pirrol (P+D) , PBG. Las condiciones experimentales son las standard. Se hicieron corridas paralelas, una se reveló con reactivo de Ehrlich (A) y la otra con ninhidrina (B).

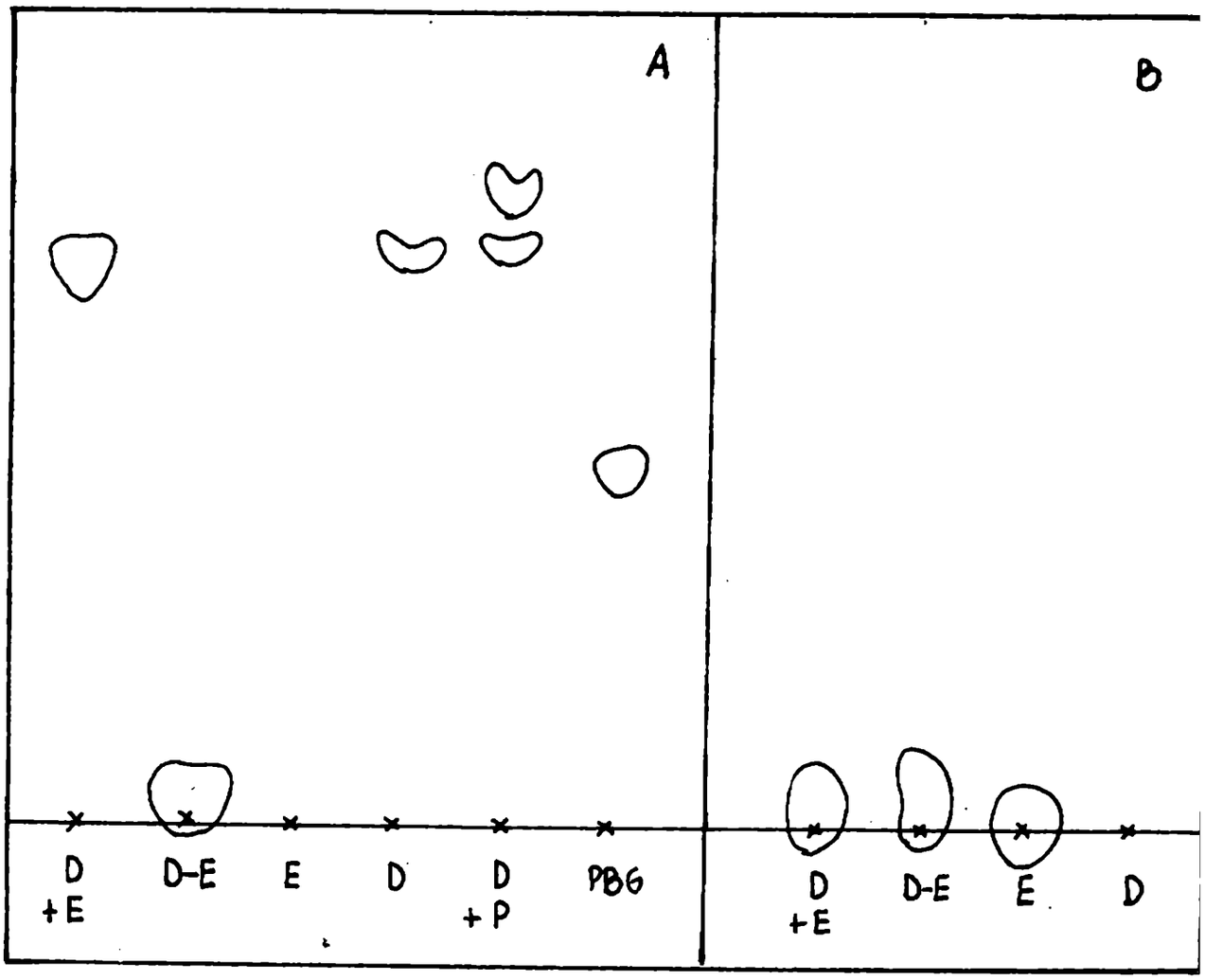


Figura 111: Cromatografía en capa delgada del D-pirrol unido a la Enzima (D-E) mezlas de D-pirrol libre y Enzima libre (D+E), y muestras de D, E, D+P y PBG
A = revelado con reactivo de Ehrlich, B = Revelado con ninhidrina

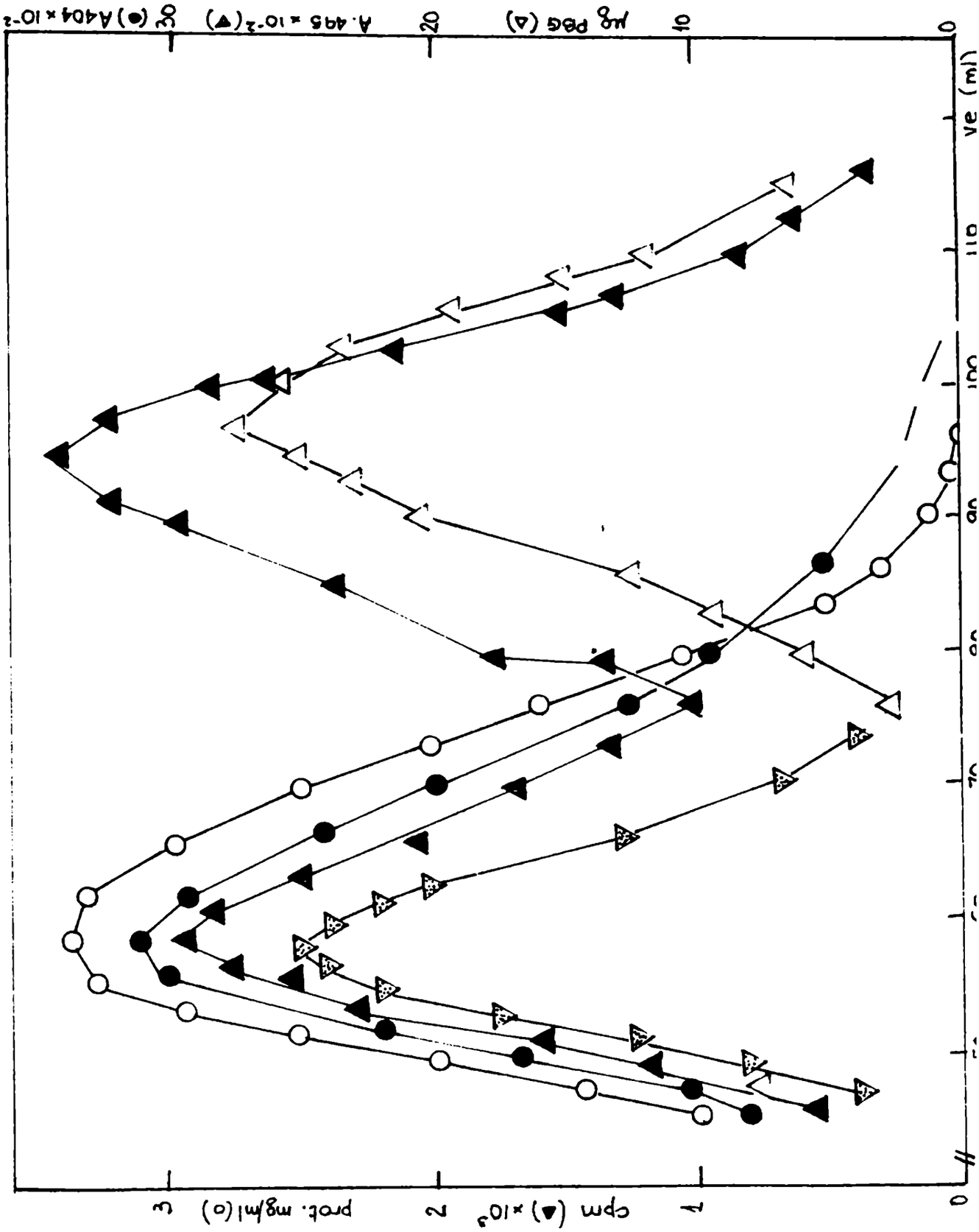


Figura 112: Cromatografía del sobrenadante conteniendo el P-pirrol intermediario unido a la enzima (P-E), obtenido incubando pellet con ^{14}C-PBG (según se describe en la Figura 108), a través de una columna de Sephadex G-25 mediano (detalles en Figura 104). (o) Proteina; (●) Porfirinas; (Δ) PBG; (▲) radioactividad; (▼) P-pirrol libre (corrido separadamente.

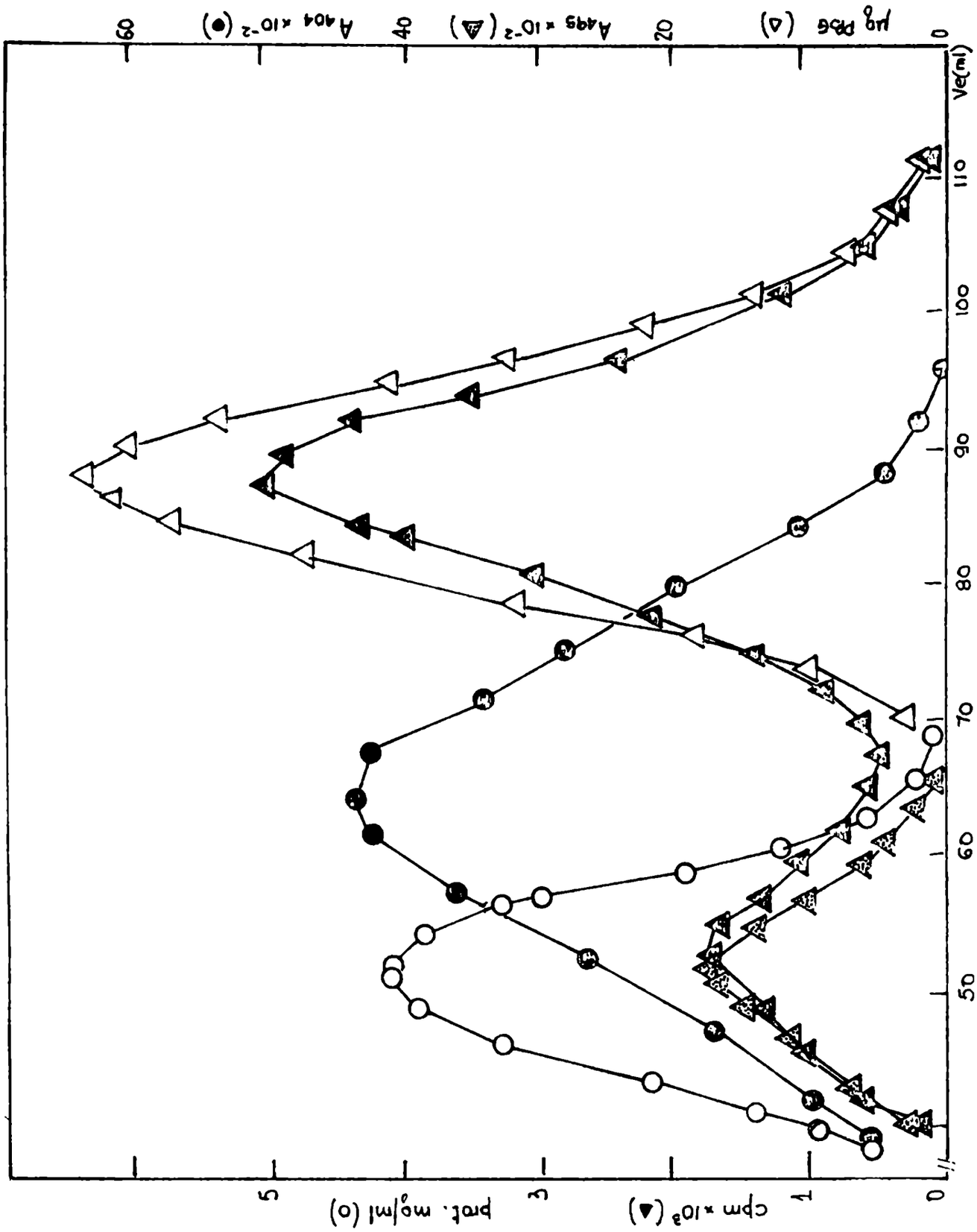


Figura 113: Cromatografía del D-pirrol intermediario unido a la enzima (D-E), obtenido incubando Deaminasa con ^{14}C-PBG (según se describe en la Figura 109), a través de una columna de Sephadex G-25 mediano (detalles en Figura 104). (o) Proteina; (●) Porfirinas ; (Δ) PBG; (▲) radioactividad; (▲) D-pirrol libre (corrido separadamente).

Podemos observar que entre los 40 y 70 ml eluye la proteína, a la cual se encuentra unido el P o el D-pirrol, identificado por reacción típica de Ehrlich en cada eluato y radioactividad, su perfil coincide con el del pirrol libre, marcado con ^{14}C, corrido separadamente en la misma columna. También se observa que dentro de la misma zona eluyen las porfirinas formadas, que si bien su cantidad total, en estas condiciones es muy baja se deben tener en cuenta; sin embargo, solo una parte de ellas se encuentra absorbida por la proteína de manera que el mayor porcentaje está en solución y puede separarse. Más atrás en la zona correspondiente al PBG (75-105 ml) se separa el monopirrol remanente, que se identifica fácilmente por la reacción de Ehrlich y radioactividad, coincidiendo ambos picos.

De acuerdo con estos datos entonces, una vez preparado el P o D-intermediario según las condiciones determinadas en cada caso, este se encontraría por lo menos en su mayor parte, asociado a la proteína, si bien no podemos saber con certeza cuán estable es dicha asociación.

En consecuencia, partiendo de la base que estos intermediarios naturales están unidos a sus enzimas, podrían o no modificar la formación de porfirinógenos dependiendo ello tanto de su estructura como de la enzima con la cual interaccionaran.

Para investigar este problema, se prepararon enzimáticamente los P y D-polipirroles y se incubaron pellet o Deaminasa, con y sin PBG en las condiciones que se detallan en las Tablas XXXVII y XXXVIII.

Como esperábamos las incubaciones de pellet con el P-enzima en la presencia de PBG (Tabla XXXVII) (Expts 20-24) no inhibieron la formación total de porfirinógenos sino que la aumentaron hasta un 180% cuando se usó un volumen de 1-2 ml de la solución P (Figura 114A) modificando solo ligeramente la distribución isomérica; sin embargo, es muy interesante notar, que estos porfirinógenos deben haberse sintetizado a partir del polipirrol agregado y del PBG remanente en la solución, por cuanto aparentemente no hubo consumo adicional de PBG.

Cuando se incubó el P-intermediario con Deaminasa y PBG se obtuvieron resultados similares (Tabla XXXVII - Expts 24-27). De nuevo se observó un aument neto de la actividad, hasta un 160% con 1,2 ml de polipirrol (Figura 114A), mientras que concomitantemente, se redujo el porcentaje del isómero I. En cuanto al consumo de sustrato, fué el mismo para todas las concentraciones o volúmenes de solución de P-pirrol-enzima e iguales a las del control (Expt 11), donde también podemos ver, que la actividad de la Deaminasa es 20 veces superior a la del pellet. De manera, que es posible que también con la Deaminasa el aumento neto en la formación de porfirinógenos se deba a la utilización del PBG remanente en la solución de P agregado por la enzima.

Cuando las soluciones conteniendo el P-intermediario, PBG remanente

Tabla XXXVII : Incorporación enzimática del P-intermediario unido a la enzima, en porfirinógenos

	Condiciones experimentales				Porfirinógeno form		PBG consumido		Tipo isomérico	
	P-int-E	PBG	Pellet	Deaminasa	nmoles	Δ nmoles	µg	Δ µg	I	III
1.	-	+	-	-	0,1351	---	29,45	---	---	---
2.	0,5	-	-	-	0,1633	0	0	---	---	---
3.	0,8	-	-	-	0,4120	0,0457	2,56	---	---	---
4.	1,2	-	-	-	0,5822	0,0327	4,83	---	---	---
5.	1,6	-	-	-	0,9661	0,2334	5,61	---	48	52
6.	0,5	+	-	-	0,5119	0,3135	31,22	1,77	---	---
7.	0,8	+	-	-	0,6433	0,1300	30,70	4,66	---	---
8.	1,2	+	-	-	0,8750	0,1577	41,45	7,17	---	---
9.	1,6	+	-	-	1,3952	0,2940	47,22	12,16	47	53
10.	-	+	-	-	1,3688	1,2317	31,82	2,37	35	65
11.	-	+	-	+	22,4320	22,2970	50,73	21,28	95	5
12.	0,5	-	+	-	0,5900	0,4267	0,70	0	5	95
13.	0.8	-	+	-	1,0567	0,6447	1,90	0	---	100
14.	1,2	-	+	-	1,3642	0,7820	4,66	0	---	100
15.	1,6	-	+	-	1,9175	0,9514	4,96	0	---	100
16.	0,5	-	-	+	2,3642	2,2009	4,72	4,72	75	25
17.	0,8	-	-	+	3,5126	3,1006	7,55	4,00	57	43
18.	1,2	-	-	+	4,3702	3,7880	11,4	6,20	55	45
19.	1,6	-	-	+	19,0650	18,0989	13,93	8,32	56	44
20.	0,5	+	+	-	2,3927	1,7808	28,9	0	---	---
21.	0,8	+	+	-	2,3508	1,7075	39,04	0	30	70
22.	1,2	+	+	-	3,0989	2,2390	38,88	0	33	67
23.	1,6	+	+	-	3,0620	1,6668	38,01	0	28	72
24.	0,5	+	-	+	23,3280	22,8161	48,65	17,43	73	27
25.	0,8	+	-	+	27,5160	26,7270	58,49	20,79	71	19
26.	1,2	+	-	+	37,2530	36,3789	61,00	19,55	74	26
27.	1,6	+	-	+	36,2630	34,8678	61,95	19,73	67	33

El intermediario p se preparó incubando 52 ml de pellt (12,65 mg proteína/ml) en buffer y 1560 µg de PBG (en 5 ml), durante 120 minutos, anaeróbicamente, en la oscuridad, a 38°C; en un volumen final de 60 ml. Después de la incubación la muestra se llevó a0°C, e inmediatamente se midieron porfirinas totales, PBG consumido, y se incubaron en las condiciones indicadas, diferentes volúmenes del P-polipirrol que se supone está unido a la enzima. Las mezclas de incubación contenían : pellet (12,65 mg/ml) o deaminasa (3,019 mg/ml) según sea, en buffer; PBG (60 µg en 0,2 ml) y P-intermediario unido a la enzima (P-int-E) (en volúmenes variables desde 0,5 a 1,6 ml), en un volumen final de 4ml. Siempre se corrieron blancos de actividad enzimática, conteniendo PBG (y la enzima agregada al final de la incubación) ó PBG agregado al final. También se hicieron controles conteniendo enzima más intermediario ó intermediario más PBG sin enizima, y los sistemas se completaron al final de la incubación. Así en cada caso se dedujeron las porfirinas formadas noenzimáticamente, también se efectuaron correciones por la cantidad de porfirinas y de PBG ya presentes originalmente en las soluciones del intermediario. En consecuencia, los Δ nmoles de porfirinógenos y los Δ µg PBG son los valores finalmente obtenidos después de haber hecho todas las correciones necesarias y representan la cantidad neta de producto formado ó sustrato consumido, bajo las condiciones descriptas. El resto de la metodología fue la standard.

Tabla XXXVIII ; Incorporación enzimática del intermediario D unido a la enzima, en porfirinógenos.

	Condiciones experimentales				Porfirinógenos form		PBG consumido		tipo isomérico(%)	
	D int.	PBG	Pellet	Deamin	nmoles	Δ nmoles	µg	Δ µg	I	III
1.	-	+	-	-	0,2082	---	28,425	---	---	---
2.	0,2	-	-	-	1,2660	0,2969	0	---	---	---
3.	0,4	-	-	-	3,0578	1,1967	0	---	---	---
4.	0,6	-	-	-	5,1095	2,2023	0	---	---	---
5.	0,8	-	-	-	6,7673	2,8910	0	---	---	---
6.	1,2	-	-	-	11,3862	5,5718	0	---	95	5
7.	1,6	-	-	-	15,8124	8,0598	0,34	---	95	5
8.	0,2	+	-	-	2,3701	0,8959	28,11	0	---	---
9.	0,4	+	-	-	4,7497	1,4837	32,50	4,08	---	---
10.	0,6	+	-	-	8,1730	2,8553	37,89	9,46	---	---
11.	0,8	+	-	-	11,5523	4,5767	34,58	10,00	---	---
12.	1,2	+	-	-	20,4989	8,9045	38,36	9,93	95	5
13.	1,6	+	-	-	30,3452	14,3246	46,46	17,70	100	---
14.	-	+	+	-	2,5498	2,3416	38,58	7,00	29	71
15.	-	+	-	+	16,0290	15,8212	49,49	21,07	85	15
16.	0,2	-	+	-	0,2108	0	0	---	---	---
17.	0,4	-	+	-	1,7252	0	0,14	0,14	76	24
18.	0,6	-	+	-	2,3963	0	0	---	64	36
19.	0,8	-	+	-	3,5545	0	0	---	62	38
20.	0,6	-	-	+	4,9795	0	0,62	0,62	---	---
21.	0,8	-	-	+	6,7838	0,0165	0,80	0,80	---	---
22.	1.2	-	-	+	13,5723	2,1861	0,92	0,92	95	5
23.	1,6	-	-	+	18,8527	3,0403	1,77	1,44	97	3
24.	0,2	+	+	-	5,4069	3,0368	40,26	12,15	---	---
25.	0,4	+	+	-	5,7697	1,0200	38,83	6,32	82	18
26.	0,6	+	+	-	11,4518	0,2788	45,51	7,62	78	22
27	0,8	+	+	-	16,2596	0	51,40	7,14	78	22
28.	0,6	+	-	+	30,8153	19,6423	52,40	14,50	95	5
29.	0,8	+	-	+	34,6536	23,1013	52,24	17,66	95	5
30.	1,2	+	-	+	37,7342	17,2353	54,07	15,71	95	5
31.	1,6	+	-	+	39,3939	8,911	56,39	9,93	95	5

El D-intermediario se preparó incubando 50 ml de Deaminasa (9,2 mg/ml) en buffer fosfato y 1500 µg de PBG (en 5 ml) durante 90 minutos, anaeróbicamente, en la oscuridad, a 38°C, en un volumen final de 55ml. Después de la incubación se trató como se describe para el P-intermediario en la Tabla XXXVII Las mezclas de incubación contenían según se indique : Pellet (22,1 mg/ml) ó Deaminasa (9,2 mg/ml) en buffer; PBG (60 µg en 0,2 ml) y D-intermediario (volúmenes variables desde 0,2 a 1,6 ml); en un volumen final de 4 ml. El resto de las condiciones experimentales ó están detalladas en la Tabla XXXVII ó son las standard descriptas en Métodos.

y las enzimas de pellet se incubaron ya sea solas, o con PBG, o Deaminasa o pellet, se obtuvieron crecientes, pero bajas cantidades totales de porfirinógenos. Así los resultados obtenidos fueron los esperados y es interesante notar u vez más, que los porfirinógenos producidos a partir de pellet y P (Tabla XXXVII - Expt 12-15) se formaron probablemente a partir del PBG remanente en la solución de P, por cuanto tampoco se detectó consumo neto del monopirrol; alternativamente estos datos también podrían sugerir que los porfirinógenos se formaron simplemente por ciclización del tetrapirrilmetano unido a la enzima ya presente en la mezcla de reacción, nosotros consideramos que esta última posibilidad es la más atractiva, aunque no podemos excluir la probabilidad de que estemos en presencia de una mezcla de diferentes especies de polipirroles que varíen tanto en la estructura como en la longitud del polipirrol de cadena abierta.

Se obtuvo apoyo adicional a nuestras hipótesis, llevando a cabo un conjunto similar de experiencias pero empleando el D-pirrol unido a su enzima (Tabla XXXVIII). Nuevamente, usando cantidades crecientes de la solución D-E, incubadas solas o con PBG y Deaminasa, produjeron un aumento lineal en la formación de porfirinógenos. Fué sumamente llamativo, sin embargo que el D-pirrol y la Deaminasa formaran menos porfirinógenos que el D-pirrol solo, que el D-pirro más PBG y sobre todo que el D-pirrol y pellet no formaran porfirinógenos adicionales; una posible explicación para estos hallazgos es que el D-pirrol estuviera de algún modo, inhibiendo la actividad de la Deaminasa y del pellet, que de otra forma deberían estar libres como para usar el PBG remanente en la solución para sintetizar más producto, o alternativamente, que las enzimas mismas, estuvieran inhibiendo la ciclización final de ese supuesto tetrapirrilmetano D presente en la mezcla de la reacción.

Es interesante notar, que las incubaciones de Deaminasa con su D-intermediario-E y PBG (Tabla XXXVIII) (Expts 28-31), incrementaron la formación total de porfirinógenos hasta un máximo de 140-150% usando 0,8 ml de la solución D y volúmenes mayores que 1,2 ml inhibieron la síntesis de Uroporfirinógeno I (Figura 114B).

También fué llamativo, que aún pequeños volúmenes de D-intermediario inhibieron significativamente la síntesis de porfirinógenos por pellet de Euglena gracilis; así con 0,4 ml la actividad remanente era de solo 40% y la inhibición ya fué completa con 0,8 ml; la composición isomérica de los productos de reacción se modificó según lo esperado.

Estos resultados han confirmado nuestras sugerencias anteriores, de que la naturaleza de los intermediarios presentes en los sobrenadantes P y D de preparaciones de Euglena gracilis son diferentes a los producidos por las enzimas de callos y además que sus estructuras no son las mismas.

Además, en condiciones normales de incubación no se detectarían polipirroles libres en el medio de reacción de manera que, muy posiblemente estos deberían estar unidos a la enzima, y tendríamos que usar cantidades considerable-

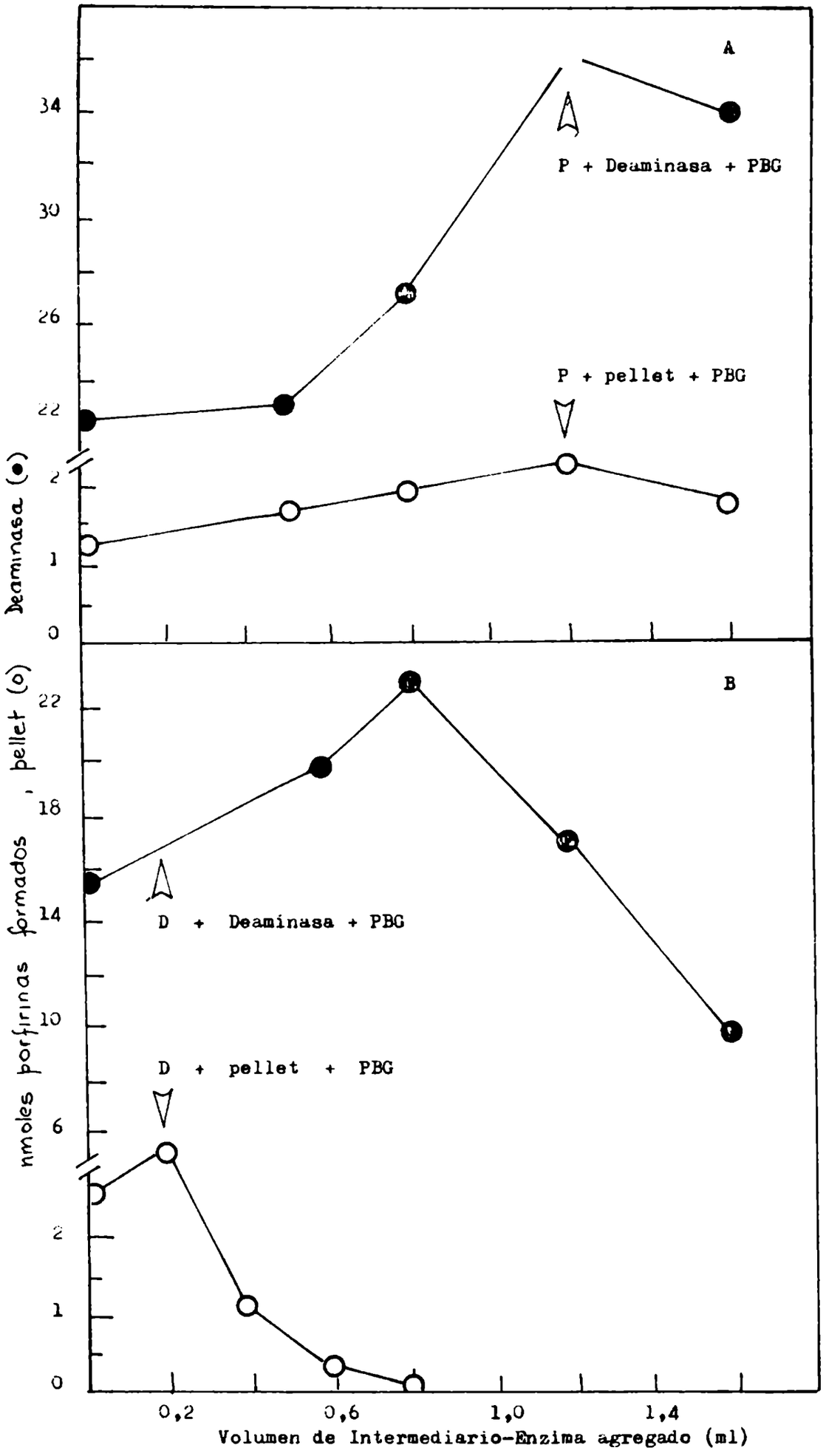


Figura 114: Efecto del polipirrol P (A) y D (B) unidos a sus enzimas, sobre la formación enzimática de porfirinógenos. Los P y D-intermediarios se prepararon como se describe en las Tablas XXXVII y XX respectivamente, las mezclas de incubación y demás condiciones también son las indicadas en las mismas Tablas (Exps 20-27) y (Exps 24 31).

mente elevadas de polipirroles libres agregados al sistema para obtener cierta incorporación en los porfirinógenos, que de todas maneras competirían siempre ineficientemente, con el sustrato natural de la enzima. Sin embargo, cuanto estos polipirroles se agregaban a las enzimas en sus formas de asociación natural, enzima-polipirrilmetano, aumentan la formación total de Uroporfirinógenos, excepto en le caso del intermediario D que inhibe la PBGasa. ES posible entonces, que los intermediarios, que parecen encontrarse listos para su ciclización, sean usados ya sea por la misma enzima a la cual están unidos, o transferidos a la enzima libre agregada adicionalmente para formar finalmente los tetrapirroles cíclicos.

III.- 7.- ALGUNAS EVIDENCIAS ACERCA DE LA ESTRUCTURA DE LOS INTERMEDIARIOS POLIPIRROLICOS NATURALES PRODUCIDOS POR LA PBGasa Y LA DEAMINASA DE EUGLENA GRACILIS.

III.- 7.- 1.- Consideraciones generales:

De acuerdo entonces con las evidencias experimentales obtenidas, nosotros propondríamos que los intermediarios polipirrólicos naturales formados por la PBGasa y la Deaminasa de Euglena gracilis serán tetrapirrilmetanos; además muy probablemente podrían ser los intermediarios que normalmente se acumularían durante el curso regular de la reacción, es decir supondiendo que la reacción de la PBGasa o aún de la Deaminasa, ocurriera en dos etapas, como también lo hemos propuesto, la primera de ellas involucraría una rápida formación de estos intermediarios sobre la superficie de la enzima y la segunda correspondería a la ciclización final de estos intermediarios. Es probable que en algunos tejidos como en los callos de soya, la velocidad de la primera etapa sea muy lenta, lo cual permitiría la detección de especies polipirrólicas de menor longitud, o tal vez, aunque menos probable a nuestro juicio que en este caso particular, la polimerización cíclica del PBG sucediera en más de dos etapas; o aún, podrían existir otros factores que modificaran la cinética de la reacción de modo tal que esa primer etapa de condensación de 4 moles de PBG presentara un comportamiento poco común y acá conviene recordar, que justamente las enzimas de callos de soya, hasta ahora constituyen el único ejemplo en el cual se ha demostrado que existen muchas de las características de una cinética homotrópica negativa; es así posible que debido a este fenómeno puedan acumularse a tiempos cortos intermediarios di o tripirrólicos. Por otro lado, en todos los demás tejidos en los cuales se ha estudiado esta reacción, no se ha encontrado en condiciones normales, es decir sin el uso de inhibidores, ninguna evidencia de la presencia de intermediarios; quizás la velocidad de la reacción de ambas etapas es tan alta, que ello haya impedido la visualización de los intermediarios. De todas maneras, consideramos que la velocidad de la reacción total es un factor muy importante en este aspecto.

Pero aún en aquellos trabajos, de Bogorad y colaboradores (1970, 1972) y de Davies y Neuberger (1973) cuando fuerzan la acumulación de intermediarios de la Deaminasa de hojas de espinaca y Rh. spheroides respectivamente, por inhibición con amonio e hidroxilamina, en ambos casos, aislan un tetrapirrilmetano lineal no isomerizado, si bien debemos recordar que Pluscec y Bogorad (1970) decía

que con hidroxilamina separaban un dipirrilmetano, usando las mismas condiciones pero una metodología más cuidadosa; Davies y Neuberger (1970) demostraron que con esa base también se acumulaba un tetrapirrilmetano.

Es decir, aún con los datos obtenidos en condiciones no fisiológicas, todas las evidencias apoyarían nuestra teoría acerca de que la ciclotetramerización enzimática del PBG, por acción del complejo PBGasa o de la Deaminasa ocurre en dos etapas; el intermediario normal sería un tetrapirrilmetano y la velocidad de la primera etapa sería mucho mayor que la correspondiente a la ciclización final y la eliminación del Uroporfirinógeno, que sería la etapa de velocidad limitante.

Ahora bien, está claro asimismo, que ese tetrapirrilmetano es distinto según provenga de la PBGasa o de la Deaminasa y teniendo en cuenta todos los datos disponibles, nosotros hemos propuesto que la estructura formada por el complejo correspondería a un tetrapirrilmetano isomerizado del tipo PAAPAPAP o TPM III, mientras que la del formado por la Deaminasa a un tetrapirrilmetano no isomerizado del tipo PAPAPAPA o TPM I, este último idéntico al TPM de Radmer y Bogorad (1972) y Davies y Neuberger (1973).

Empleando entonces preparaciones del P y D-polipirrol natural libre de Euglena, obtenido según las condiciones ya descriptas, salvo se indique lo contrario, se llevaron a cabo una serie de ensayos con el objeto de obtener algunas evidencias experimentales que nos permitieran apoyar o modificar nuestra hipótesis.

III.- 7.- 2.- Reacción de los intermediarios con el reactivo de Ehrlich:

Los P y D-polipirroles libres no mostraron absorción distinta en la región del visible, en consecuencia se trata de bilanos.

Ya mencionamos antes, que la reacción de estos compuestos con el reactivo de Ehrlich modificado es muy intensa y rápida, con un intenso color rojo púrpura o rojo oscuro, distinto al típico rojo magenta del PBG. Este color se desvanece mucho antes que el del PBG, y el espectro de absorción muestra, además de un máximo a 565 nm, un segundo tipo a 495 nm que aumenta en intensidad con el tiempo (Figura 115). Estos datos son parecidos a los reportados por Radmer y Bogorad (1972) y Davies y Neuberger (1973) para el tetrapirrol aislado en sus experimentos con amonio e hidroxilamina. El Uroporfirinógeno dá reacción de Ehrlich negativa.

El D o P-polipirrol oxidados no dan reacción de Ehrlich positiva. Las soluciones de D o P-polipirrol a pH neutro fueron bastante estables entre 0-4°C en ausencia de aire y luz y por congelamiento. Si se dejan estar, un cierto tiempo, forman Uroporfirinógenos espontáneamente a muy baja velocidad entre 0-4° a una moderada velocidad a 37°C (como veremos) y muy rápidamente a temperaturas más elevadas.

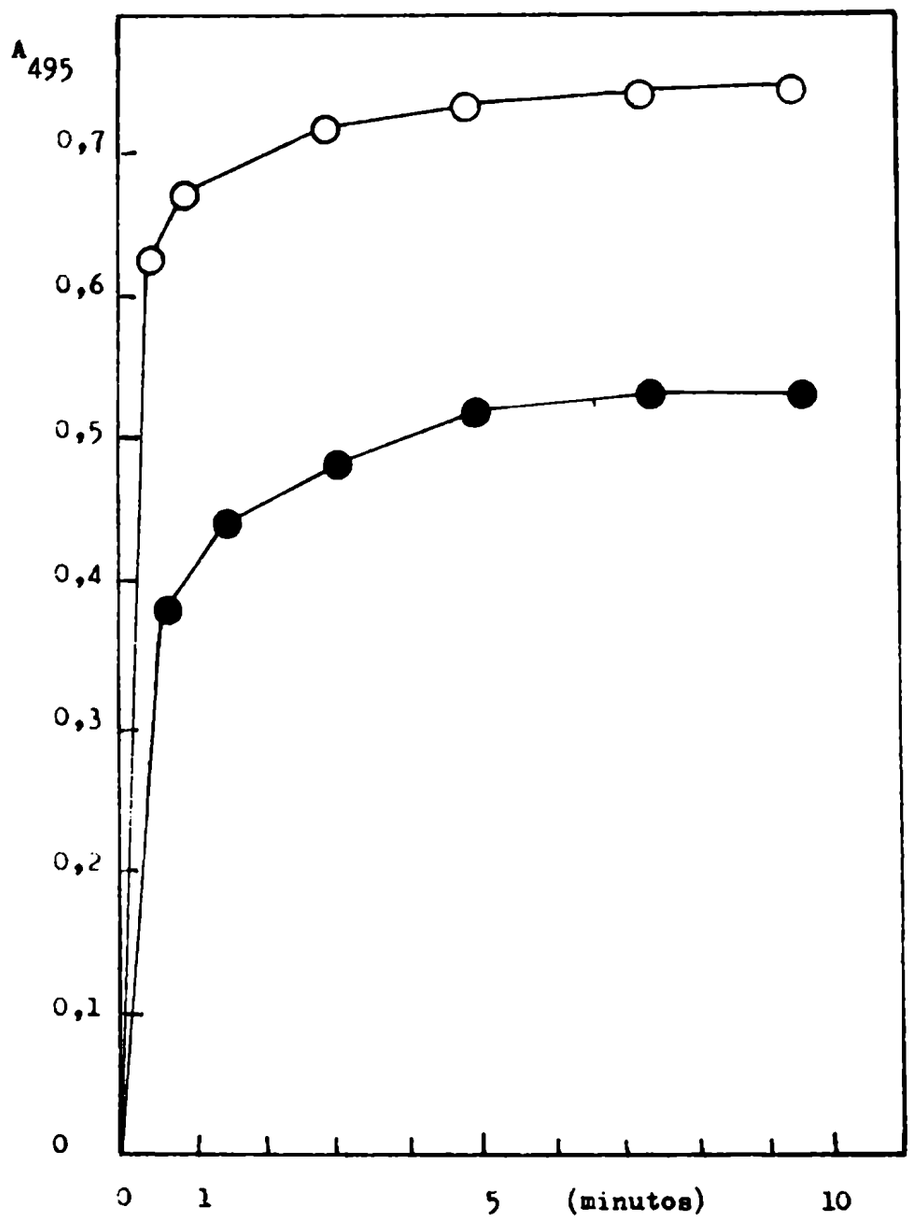


Figura 115: Cambio en la absorbancia a 495 µm en función del tiempo, en la reacción de Ehrlich del P-polipirrol (o) y D-polipirrol (•).

En su conjunto estos resultados sugerirían que el P y D-polipirrol tendrían la misma estructura general de un polipirrol de cadena abierta con una o ambas posiciones α libres.

III.- 7.- 3.- Síntesis no enzimática de porfirinógenos a partir de los intermediarios polipirrólicos:

Empleando distintas preparaciones del P y D-pirrol libres se estudió su capacidad para la síntesis química de porfirinógenos. Para ello se efectuaron incubaciones a 20 y 37°C con cantidades variables del D-polipirrol según se describe en la Figura 116, y a 37° con el P-polipirrol (Figura 117).

Los resultados obtenidos con el D-polipirrol (Figura 116) muestran como anticipamos, que la velocidad de condensación no enzimática es más lenta a menores temperaturas y aumenta con la temperatura y la concentración de polipirrol, notemos que con 3 ml a 37°C es prácticamente 10 veces mayor que con 1,2 ml a igual temperatura. Lo que también se encuentra y es importante es que la reacción de síntesis química es de primer orden, indicando que la formación de los Uroporfirinógenos resulta de la ciclación de una única molécula de un tetrapirrilmetano, más que de una condensación de mono, o polipirroles (Franck et al, 1976).

Por otra parte, un análisis del tipo isómerico de los porfirinógenos formados reveló entre un 70-80% de URO I. Recordemos que Franck y Rowold (1975 encontraron que la síntesis química de Uroporfirinas a partir del tertapirrilmetano no isomerizado PAPAPAPA producía 80% de Uroporfirina I en tanto que el tripirrano PAPAPA, una mezcla de 1:1 de Uro I a III; para los dipirranos PAPA y PAAP Frydman et al (1976) hallaron mezclas de Uro I y IV variables y sólo Uro II respectivamente.

Según nuestros datos nos atrevemos a proponer que la estructura del D-polipirrol de Euglena sería entonces predominantemente, la de un tetrapirrilmetano lineal de cadena abierta no isomerizado: PAPAPAPA; de acuerdo con lo anticipado.

En la Figura 117 se muestran los resultados de la síntesis química de porfirinógenos a partir del P-polipirrol de Euglena; también revela una reacción de primer orden, por lo cual cabe el mismo razonamiento anterior y del análisis del tipo isomérico, cerca del 80% corresponde a Uro III. No hay en la literatura datos acerca de la condensación química de otro tetrapirrilmetano que no sea el PAPAPAPA, sin embargo, Frydman et al (1976) han reportado que el tripirrano PAAPAP usualmente produce 70% de Uro III y 30% de Uro I de manera que por aproximación a estos resultados podríamos casi asegurar que el P-polipirrol de Euglena sería un tetrapirrilmetano de cadena abierta isomerizado, posiblemente del tipo PAAPAPAP o PAPAPAAP, en realidad ambas estructur son iguales pero considerando arbitrariamente, que la dirección de síntesis o

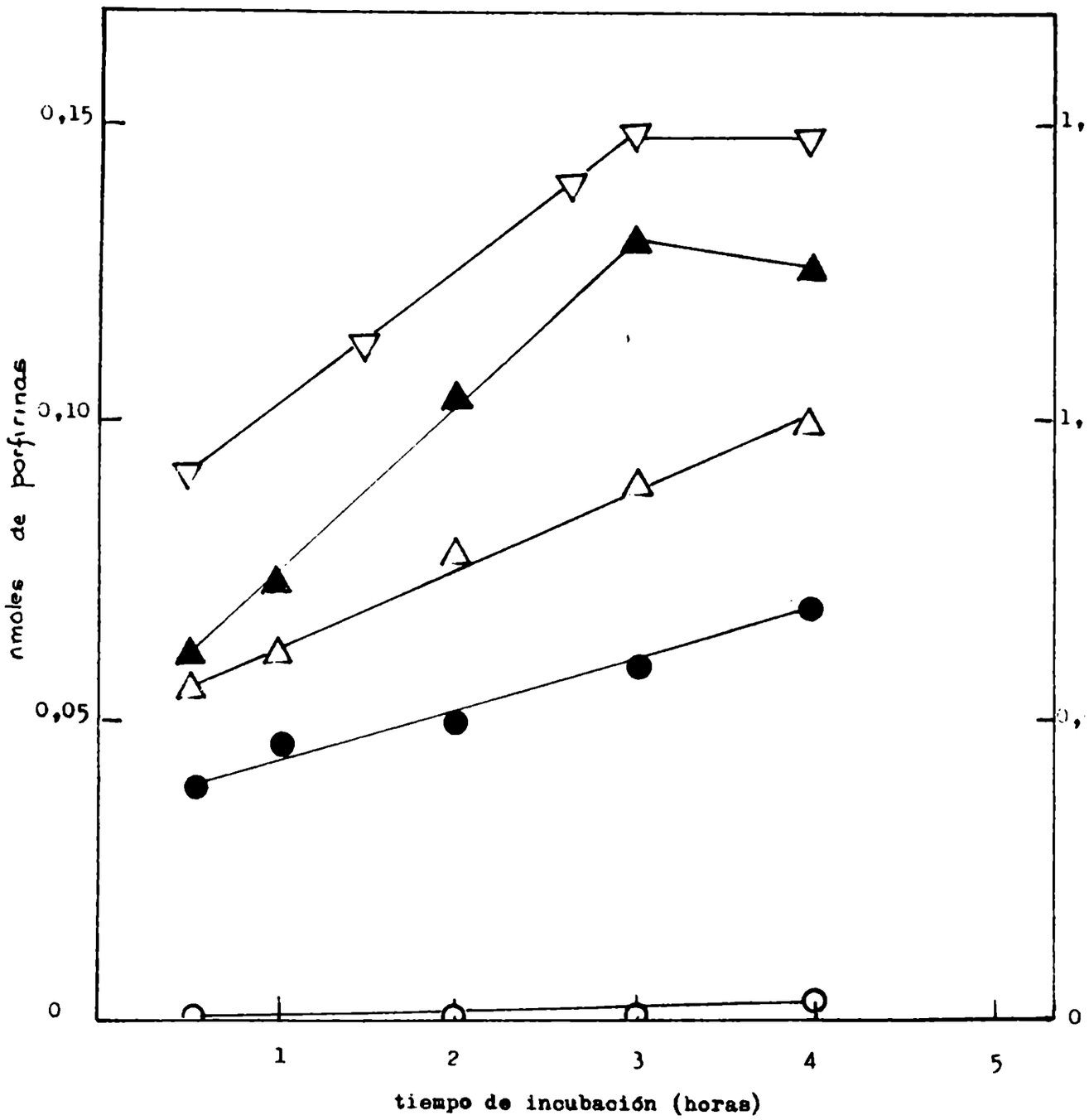


Figura 116: Síntesis no enzimática de porfirinas, a partir del intermediario D-pirrol libre, empleando: 0,6 ml a 4°C (o); a 20°C (•) y a 37°C (Δ); 1,2 ml a 37°C (▲) y 3 ml a 37°C (▽) (escala en ordenadas sobre la derecha)

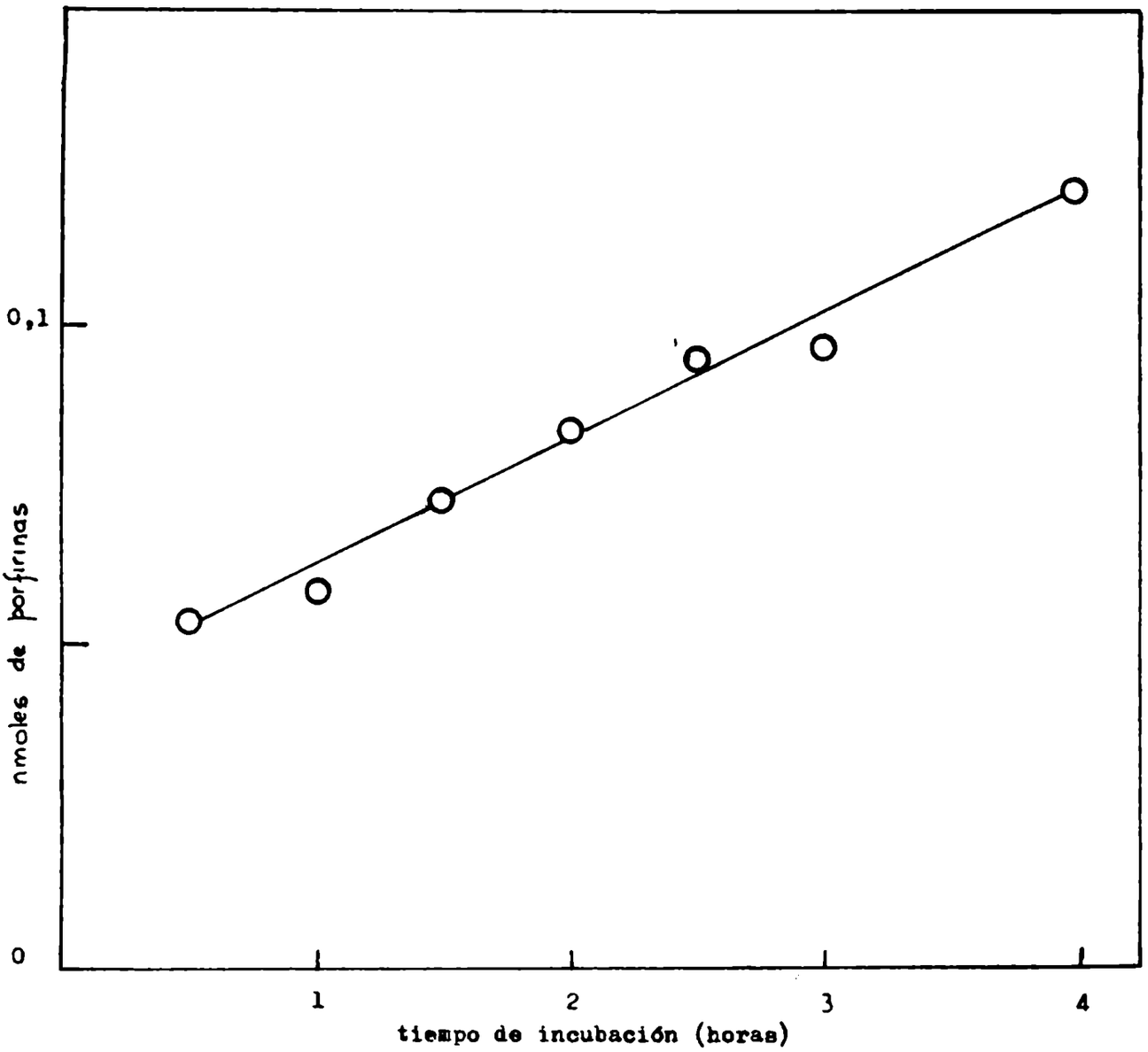


Figura 117: Síntesis no enzimática de porfirinas a partir del P-intermediario libre, empleando 3 ml a 37°C.

de crecimiento del polipirrol sobre la superficie enzimática es de izquierda a derecha, queremos dejar abierta la posibilidad de que la isomerización ocurriera bien al comienzo mismo de la reacción o al final, a pesar de que el mayor cúmulo de evidencias estaría en favor de la primer alternativa.

III.- 7.- 4.- Efecto de pH sobre la formación no enzimática de porfirinógenos a partir de los P y D-intermediarios de Euglena:

Partiendo de la base que las estructuras propuestas para el P-intermediario sería un PAAPAPAP y para el D-intermediario PAPAPAPA, la diferencia entre ambas, además de la isomerización, sería que en el P tendríamos los dos extremos α y α' libres, en tanto que en el D sólo un α libre y en el otro lado un resto $-CH_2NH_2$. Para aportar entonces evidencias adicionales en apoyo de nuestra hipótesis, se llevaron a cabo una serie de ensayos, incubando soluciones de P y D-polipirrol en ausencia de enzima, a diferentes pHs, para determinar si en alguno de los polipirroles habría un grupo amino ionizable que tendría que aceptar la reacción de ciclización; de no haberlo, era de esperar que ésta estuviera favorecida a pH neutros.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XXXIX y nos sugieren que en el P-polipirrol hay un grupo amino presente y que la velocidad de ciclización no enzimática es mayor cuando ese grupo está protonado, a pH 8,5. Considerando que el pKa del grupo amino del polipirrol es aproximadamente el mismo que el pKa del PBG = 10, a pH 8,5, el grupo amino estaría completamente protonado, mientras que a pH 12,0 prácticamente no habría grupos protonados. Esto explicaría la menor velocidad de ciclización a otros pH, sin embargo, el efecto, aunque significativo debería haber sido todavía mayor si la protonización fuera el único factor limitante de la ciclización. Resultados parecidos, empleando el tetrapirrilmetano no isomerizado obtenido por inhibición con amonio, fueron encontrados por Radmer y Bogorad (1972). Estos datos, agregarían una prueba más a nuestra propuesta de que el D-intermediario de Euglena sería un PAPAPAPA.

Por otra parte, el comportamiento del P-pirrol de Euglena también pareció corresponder a nuestras expectativas; sería un tetrapirrilmetano con ambas posiciones α y α' libres, es decir un PAAPAPAP; pero además, como se aprecia con el P-polipirrol existen otros factores vinculados con el pH del medio que afectan en grado también significativo, la síntesis química de los Uroporfirinógenos a partir de los tetrapirrilmetanos y que probablemente involucren las cadenas laterales en β y β', acetato y propionato de cada pirro y su posición relativa.

Tabla XXXIX : Efecto del pH sobre síntesis no enzimática de uroporfirinógenos a partir de los P y D-polipirroles

pH	P - polipirrol		D - polipirrol	
	Δ nmoles porfirinas	Δnmoles a pH_x / Δnmoles a pH7,4	Δnmoles porfirinas	Δnmoles a pH_x / Δnmoles a pH8,5
6,0	0,00228	0,05	0,01872	0,12
7,4	0,03969	1,00	0,08316	0,54
8,5	0,01890	0,47	0,15192	1,00
12,0	0,00321	0,08	0,04609	0,30

La obtención de P y D-polipirrol se realizó en la forma descripta en las leyendas de las Tablas XXXVI y XXXVII . Cada sobrenadante neutralizado (conteniendo el P ó D pirrol) se corrió por una columna de Sephadex G-25 (1 m de alto, 1,5 cm de diámetro) (Figuras 104 y 107) del eluído recogido entre los 55 y 65 ml, se emplearon en cada caso 3 ml para P y 1,2 ml para D, llevados a los pH indicados. El P-pirrol se incubó 4 horas y el P-pirrol 2 horas, anaeróbicamente. El resto de las condiciones experimentales fueron las standard. En todos los casos se efectuaron las correcciones por las porfirinas presentes a tiempo cero, que acompañan al pirrol en su solución.

IV.- EVIDENCIAS ACERCA DE LA EXISTENCIA DE UN FACTOR REGULADOR QUE CONTROLARIA LA SINTESIS ENZIMATICA DE PORFIRINOGENOS EN EUGLENA.

IV.- 1.- ACTIVACION POR ESTACIONAMIENTO.

Recordemos que desde los comienzos de estos estudios con las enzimas de Euglena se había observado que la actividad del homogenato inicial era muy baja comparada ya fuera individualmente o con la suma de las actividades del sobrenadante y pellet resultante de su centrifugación, como si después de este proceso se liberara algún compuesto que tal vez activara la reacción.

Por otro lado, habíamos observado que cuando se dejaban en la heladera suspensiones o soluciones de homogenato y sobrenadante o los pellets correspondientes, dos o tres días, y se volvían a emplear en nuevas experiencias, las actividades de estas preparaciones eran ligeramente mayores o a lo sumo iguales, dependiendo del tiempo de estacionamiento y de la fracción; ésto también estaba sugiriendo que en esas condiciones podría estar liberándose algún activador o alternativamente destruyéndose un inhibidor.

Este aparente fenómeno de activación espontánea por estacionamiento ocurre con bastante frecuencia y ya teníamos una rica experiencia al respecto, cuando estudiamos el ALA-S de callos de soya (Wider de Xifra et al, 1971). De manera que se investigó en particular qué sucedía con las actividades de las fracciones H, S y P, cuando se las dejaba estacionadas a 4°C, a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos, se ilustran en la Figura 118. Aquí se comprobó que efectivamente tenía lugar una activación de las tres fracciones, que llegaba a un máximo de 8 y 4 veces la actividad inicial a los 22 días para sobrenadante y pellet y de 7,5 veces para homogenato a los 14 días.

IV.- 2.- BUSQUEDA DEL FACTOR MODIFICADOR DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.

Un ensayo muy simple para obtener alguna evidencia orientadora acerca del tipo de compuesto que podría estar produciendo este fenómeno de activación consiste por ejemplo, en calentar la solución proteica en cuestión, separar la proteina precipitada por centrifugación y analizar el efecto del agregado del sobrenadante a una preparación fresca de esa misma solución, o bien someterla a un pasaje a través de Sephadex G-25 grueso y determinar la actividad en el eluído proteico. Si el factor fuera termoestable, tendríamos que apreciar algún cambio en la actividad de la mezcla con respecto al control solo. Si se tratara de una molécula de bajo peso o que se separara de la proteína por el tamiz molecular, la preparación resultante debería ser más o menos activa que la original.

Los resultados de una experiencia de esta naturaleza se ilustran en la Tabla XL. Según ellos, todo parecía indicar que estábamos en presencia de un factor modificador, separable de la proteína por Sephadex G-25, de bajo peso molecular y tal vez termoestable. El agregado del factor calentado, a la fracció de la cual provenía, manteniendo una relación de 1 ml de preparado original y el sobrenadante de 1 ml sometido a calentamiento, produjo un aumento de la acti-

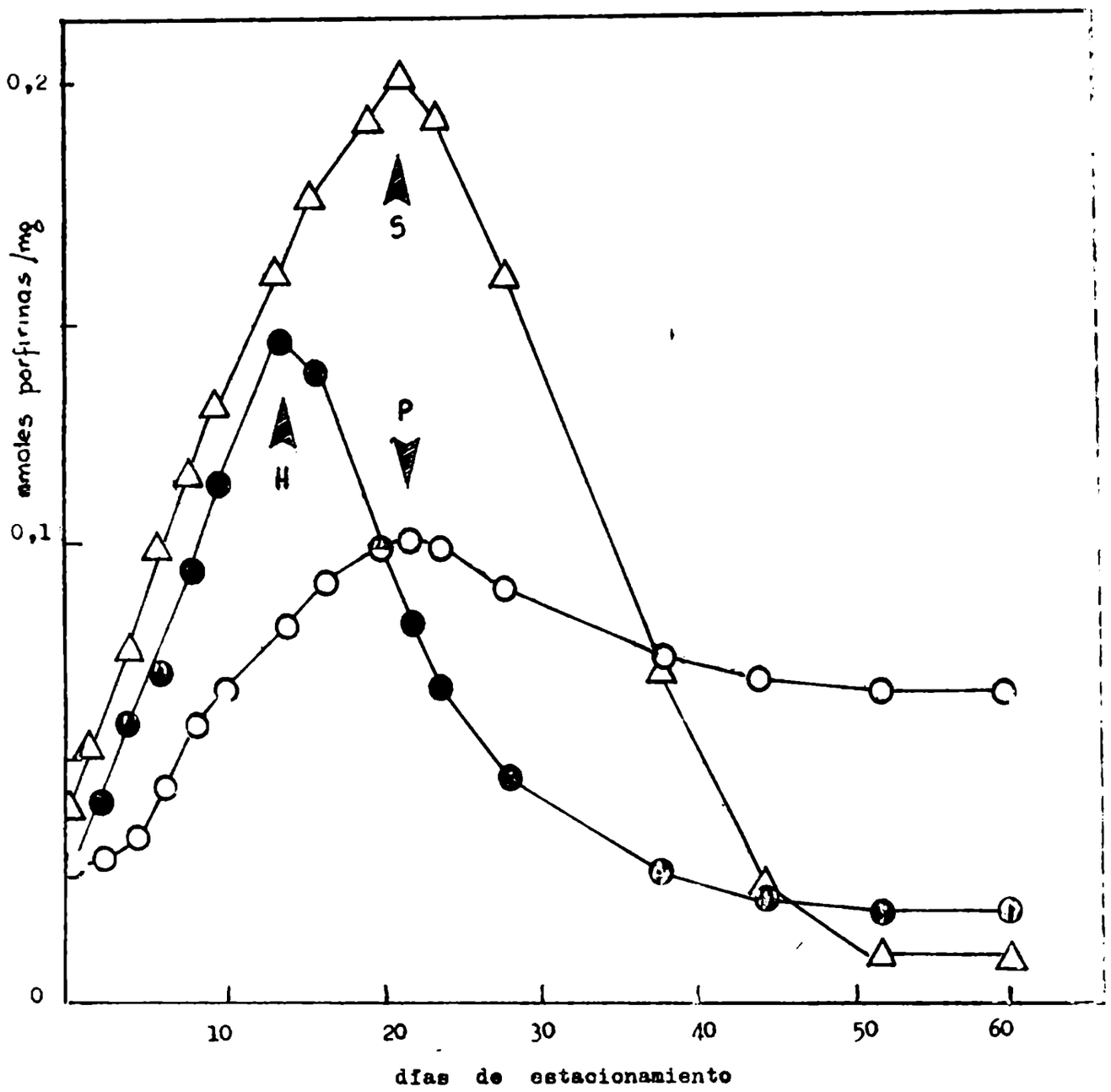


Figura 118: Efecto del tiempo de estacionamiento sobre las fracciones H (o), S (Δ) y P (o), obtenidas a partir de células frescas de Euglena. Las soluciones de H y S y el pellet se guardaron en heladera a 4°C y a los tiempos indicados se tomaron muestras para determinar actividad enzimática.

Tabla XL : Activación de homogenato y sobrenadante por pasaje a través de Sephadex G-25 y agregado de sus correspondientes sobrenadantes de calentamiento.

Sistema de incubación	H	S	P	H Ø	S Ø	PrH	PrS	H+H Ø	S+S Ø
nmoles porfirina / mg	0,028	0,043	0,065	0	0	0,308	0,430	0,085	0,128
% actividad	----	----	----	----	----	1,100	1,020	303	297

Para la obtención de H Ø y S Ø se calentaron homogenatos y sobrenadantes 10 minutos a 100 °C en baño de agua, luego se centrifugaron 10 minutos a 10.000 rpm, se descartó el precipitado y el sobrenadante se empleó como fuente de H Ø y S Ø respectivamente. Las proteínas de H (PrH) y de S (PrS) se obtuvieron sembrando 10 ml de cada fracción, conteniendo aproximadamene 300 mg de proteína, en una columna de Sephadex G-25 grueso(1,8 cm de diámetro; 50 cm de altura) equilibrada y eluída con buffer de fosfato pH 7,4. Se recogió la proteína eluida entre los 35 y 65 ml, que se usó como fuente de PrH y PrS. Las condiciones de incubación fueron las usuales, empleándose 2 ml de solución en los casos de un solo componente; cuando se trataba de mezclas, la relación entre ambos componentes fué de 1:1 en volumen. El resto de las condiciones experimentales fueron las standard. El % de actividad se calculó , tomando como 100% el de los respectivos controles H y S.

vidad de tres veces tanto para H como para S. Por otro lado, fué aún superior el efecto del pasaje de la proteína por Sephadex G-25; la PrH y PrS resultante eran entre 10 y 11 veces más activas que H y S respectivamente; estos datos no eran del todo congruentes con los de los sobrenadantes de calentamiento. Una interpretación quizás precipitada nos haría pensar que lo que se había separado era algún tipo de inhibidor, más que un activador. Era necesario entonces profundizar los estudios.

Se llevaron así a cabo corridas cromatográficas en Sephadex G-25 grueso, del homogenato y del sobrenadante determinándose la actividad enzimática y el contenido proteico en cada eluato; pero además, considerando que el posible factor eluyera en la zona de baja o nula actividad enzimática, a un ml de cada uno de esos eluatos se le agregó un ml de una solución de la misma proteína eluida al comienzo con una actividad específica del orden de 0,3 mmoles porfirinas/ml o bien de la mitad de la actividad específica máxima.

Los resultados se pueden ver en las Figuras 119 y 120. La actividad enzimática eluye solo ligeramente desplazada del Vo, entre los 35 y 70 ml; lo interesante es que cuando a las fracciones que eluyeron en la zona de los 75-120 ml se le agregó la preparación enzimática proveniente de esa misma columna, que llamaremos PrH y PrS, según vengan de homogenato o sobrenadante respectivamente, cuya actividad se llevó al medio se reveló la presencia, de un componente que duplicó su actividad inicial.

Es decir, que por un lado, estos hallazgos estarían de acuerdo con la existencia de un compuesto, que activaría el sistema enzimático, tanto en homogenato como en sobrenadante; pero al mismo tiempo esa misma preparación había sufrido un incremento muy significativo, alrededor de 10 veces por el simple pasaje a través de una columna de G-25.

Cabría aclarar aquí, que no se hicieron los mismos experimentos con pellet, pues es inconveniente la corrida de una suspensión de pellet por geles de Sephadex, y su calentamiento produce una masa muy densa de proteína precipitada, que deja muy poco volumen de líquido sobrenadante; además el grado de activación espontáneo de esta fracción fué mucho menor y se vió que, en experiencias posteriores, si el pellet se lavaba dos veces con buffer, se reducía significativamente, por lo cual lo atribuímos a la presencia de sobrenadante ocluído.

V.- 3.- ESTUDIO DEL EFECTO DEL FACTOR MODIFICADOR SOBRE LA ACTIVIDAD DE DIFERENTES PREPARACIONES ENZIMATICAS.

Con la información disponible solo habíamos confirmado y detectado la presencia en homogenato y sobrenadante de un factor que podría estar controlando la actividad enzimática y que quizás cumpliera, "in vivo", un papel importante en la biosíntesis de porfirinas en Euglena. Aparentemente el compuesto obtenido por calentamiento de H y de S, que llamaremos H ∅ y S ∅, se comportaría en forma similar y lo mismo se aplicaría a los factores eluídos de Sephadex

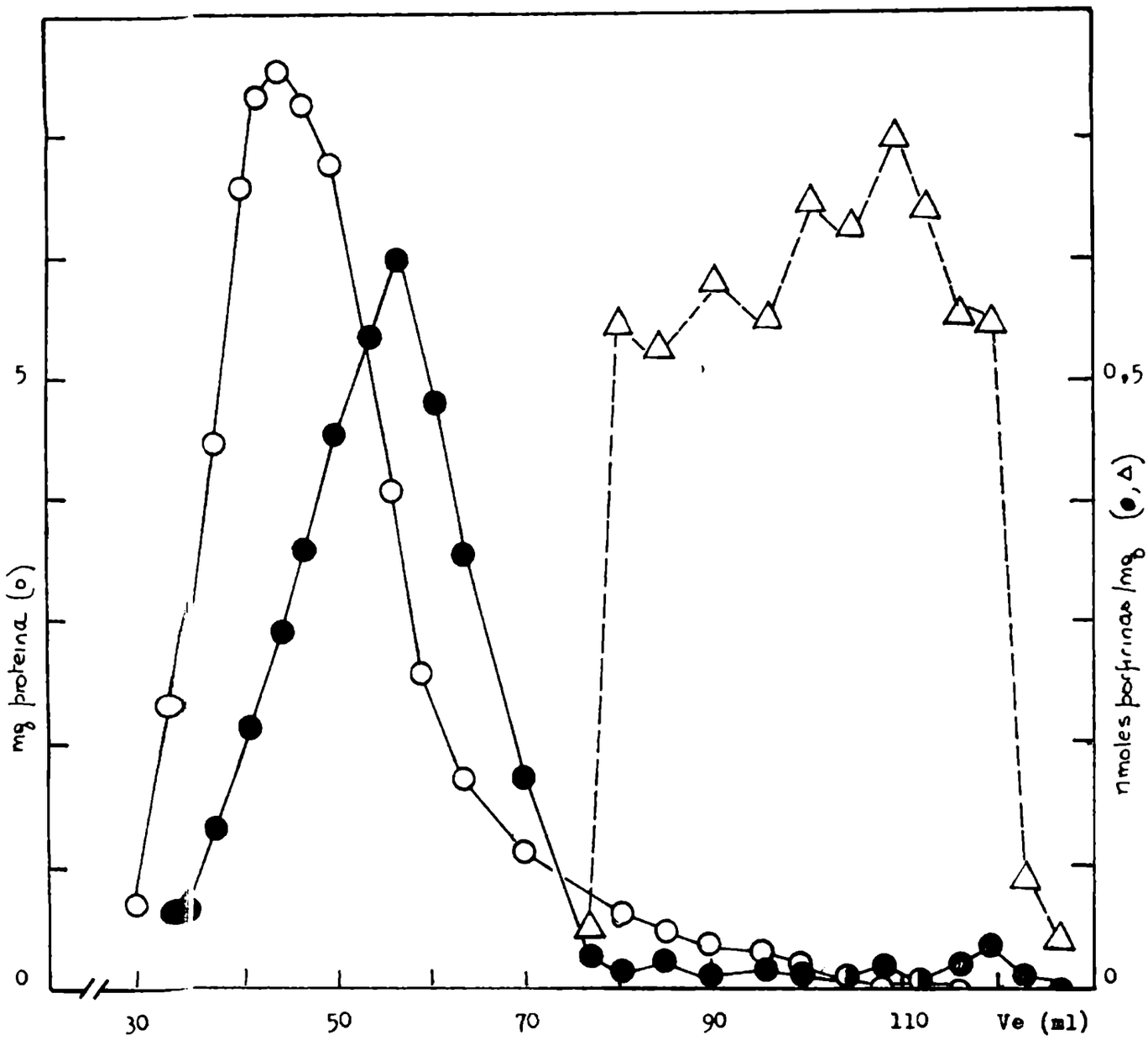


Figura 11 9: Cromatografía, a través de una columna de Sephadex G-25 (Vc=90ml, Vo=30ml) equilibrada y eluida con buffer fosfato, de la fracción Homogenato obtenida de células frescas de Euglena. Contenido proteico (o), actividad enzimática de PrH (●). A los eluatos con bajo o nulo contenido proteico se les agregó, en la relación 1:1 (ml:ml), proteina proveniente de la banda con actividad enzimática (PrH), con una actividad específica del orden de la mitad de la correspondiente al máximo (Δ).

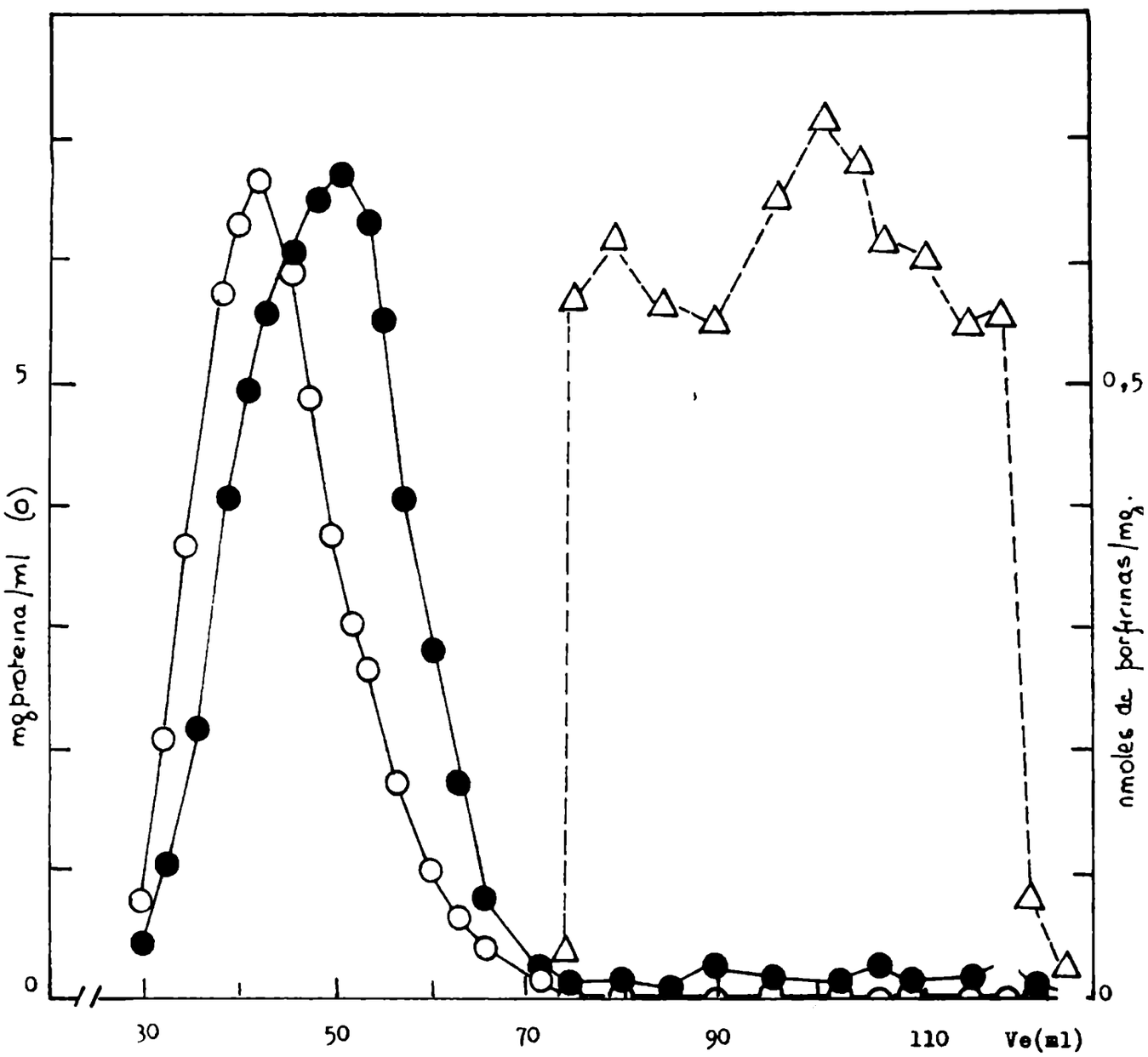


Figura 120: Cromatografía a través de una columna de Sephadex G-25 de la fracción Sobrenadante obtenida de células frescas de Euglena. Contenido proteico (o), actividad enzimática de PrS (•), Actividad del eluato con agregado de proteina enzimáticamente activa (PrS) (Δ). Todas las demás condiciones son las mismas que las detalladas en la Figura 119.

que designaremos F_H y F_S; entre pares podría tratarse de la misma molécula o aún todos ellos, pero no podemos de modo alguno arriesgar tal propuesta sin contar con mayor información acerca de ellos. Resultó de interés investigar el efecto de estas cuatro fuentes de factor modificador Hø, Sø, F_H y F_S, sobre la actividad de las enzimas de H, S, P, PrH y PrS. Los resultados y detalles de la experiencia se muestran en la Tabla XLI. Como se encontró en todos estos estudios, el pasaje de H o S por G-25 produce una PrH y PrS 10 ó más veces activa. Es notable que el efecto producido por el par Hø-Sø sobre fracciones idénticas es el mismo; con el par F_H-F_S sucede algo análogo. Si arbitrariamente definiéramos una unidad de factor activador como la cantidad del mismo que es capaz de expresarse efectivamente y producir un incremento de dos veces de la actividad de control, podríamos comparar más fácilmente los resultados de esta Tabla. Si bien en todos estos casos estamos empleando exactamente la misma cantidad en volumen de todos los factores y además la que provendría del tratamiento por calentamiento o gel de un volumen igual de H o S, se encuentra que la cantidad de unidades que puedan manifestarse en su máxima capacidad difiere según la preparación enzimática sobre la cual actúan. Tomando aquellos casos en los cuales Hø y Sø producen mayor incremento como los de máxima expresión activante y suponiendo que eso es cierto (aunque habría que hacer las curvas de saturación de activador para asegurarlo), vemos que su efecto es algo mayor (14%) sobre el sobrenadante que sobre el homogenato, de todas formas en un ml habría alrededor de 2,5 unidades de factor activo; en cambio esos mismos Hø y Sø no tendrían sitio de acción sobre las PrH o las PrS. En cuanto al F_H y F_S, aplicando un razonamiento similar, un ml contendría unas 3,3 unidades de factor activo y también su influencia es 14% mayor sobre el sobrenadante con respecto al homogenato. Pero a diferencia de los factores calentados, los F_H y F_S activan al doble las PrH y PrS, es decir tienen la posibilidad de expresar de 1 a 1,2 unidades (el 36% de las iniciales) de su poder estimulatorio sobre la actividad y curiosamente el efecto es también alrededor del 12% mayor sobre las PrS que sobre las PrH. También debe notarse que no influencian de ninguna manera la actividad del pellet, es decir no existirían sitios de interacción para los F_H y F_S sobre pellet.

Estos resultados estarían indicando, que si bien tanto Hø-Sø y F_H-F_S contendrían una molécula o un sistema activador; quizás este fuera originalmente el mismo en todos los casos; sin embargo por efecto del calentamiento, puede haber ocurrido alguna alteración en su estructura, de manera que a nivel de su comportamiento frente a las PrH y PrS, las Hø y Sø son incapaces de expresar sus propiedades activantes o tal vez las diferencias sean otras.

IV.- 4.- ESTABILIDAD DE LOS FACTORES F_H y F_S.

IV.- 4.- 1.- Termoestabilidad:

Con el objeto de conocer la estabilidad al calentamiento de F_H y F_S y determinar si este tratamiento producía algún cambio en su estructura, que disminuyera su capacidad activante como se había sugerido podía ser la causa

Tabla XLI : Efecto de los sobrenadantes de calentamiento de H y S y del Factor de regulación obtenido de las mismas fracciones sobre la actividad de varias preparaciones enzimáticas.

Sistema de incubación	nmoles porfirinas / mg proteina	µg PBG cons / mg proteina	actividad relativa(*)	unidades de factor(**)
H	0,0254	0,6512	----	----
S	0,0266	0,8043	----	----
P	0,1467	1,3036	----	----
PrH	0,2473	1,849	9,73	----
PrS	0,3128	2,231	11,72	----
H + HØ	0,1095	1,033	4,30	2,15
H + SØ	0,1093	1,037	4,30	2,15
H + F_H	0,1208	1,219	4,76	2,38
H + F_S	0,1278	1,223	5,03	2,50
S + HØ	0,1300	1,222	4,87	2,43
S + SØ	0,1320	1,245	4,94	2,47
S + F_H	0,1780	1,539	6,67	3,33
S + F_S	0,1775	1,519	6,65	3,32
P + F_H	0,1440	1,672	0,98	----
P + F_S	0,1430	1,678	0,97	----
PrH+ HØ	0,2899	2,166	1,17	----
PrH+ SØ	0,3036	1,995	1,22	----
PrH+ F_H	0,4992	2,777	2,02	1
PrH+ F_S	0,5429	2,796	2,09	1,04
PrS+ HØ	0,3614	2,330	1,15	----
PrS+ SØ	0,4211	2,149	1,30	----
PrS+ F_H	0,7669	3,703	2,45	1,27
PrS+ F_S	0,7114	3,209	2,27	1,14

(*) La actividad relativa,se calculó tomando los datos para porfirinas formadas, en base a la actividad de cada mezcla, con respecto a la de su correspondiente control. HØ, SØ, F_H y F_S no tienen actividad enzimática. Los valores para PrH y PrS, se refieren al aumento en relación con H y S. La obtención de HØ, SØ, PrH y PrS está descripta en la Tabla XL. F_H y F_S, corresponden a la fracción eluída de las mismas columnas de G-25 empleadas para reparar PrH y P recogida entre 85 y 115 ml (Figuras 119 y 120). La relación de los componente de la mezcla es 1:1(v:v). El resto de las condiciones experimentales son las standard. (**) Se define una unidad de factor, arbitrariamente como la cantid del mismo que es capaz de actuar efectivamente y producir un aumento de 2 vec de la actividad del control.

del comportamiento diferente de los Hø y Sø frente a las PrH y PrS, a efectos totalmente comparativos se emplearon fracciones iguales, pero solo se ensayó cada factor con su correspondiente prteína: Pr. Los F_H y F_S se calentaron 10 y 20 minutos a 100°C y luego se estudió su comportamiento. En la Tabla XLII vemos que el calentamiento de los F_H y F_S no produjo ningún cambio detectable por lo menos, en estas condiciones, no hubo variación de las unidades en ningún caso y nuevamente los Hø y Sø no tuvieron efecto sobre las respectivas PrH y PrS; de manera que deberíamos excluir que fuera solamente el calentamiento la razón del comportamiento diferencial entre los Hø y Sø y F_H y F_S. Además los F_H y F_S son obviamente termoestables.

IV.- 4.- 2.- Tiempo de estacionamiento:

A lo largo de 7 días se midió la actividad de muestras dr PrH, PrS, F_H y F_S mantenidas en la heladera. Los resultados se muestran en la Figura 121. Podemos decir que tanto los factores como las proteínas correspondientes PrH y PrS son bastante estables por lo menos hasta el octavo día.

IV.- 4.- 3.- Efecto del tratamiento con ácidos y álcalis:

Los factores F_H y F_S y los sobrenadantes de calentamiento Hø y Sø se trataron con un volumen igual de NaOH y HCl de concentraciones variables desde 6N hasta 1N, durante 1 y 2 minutos a temperatura ambiente. Luego de neutralizados se estudiaron sus efectos sobre la actividad de las PrH y PrS, H y S, en general, no solo se encontró que habían perdido su capacidad activante totalmente, sino que en algunos casos hubo disminución de la actividad enzimática. De manera que podemos agregar, que el efecto estimulante de estos factores se destruye por tratamiento con ácido o base.

IV.- 5.- EFECTO DEL FACTOR F_S, DEL ACIDO FOLICO Y DEL PLOMO SOBRE LAS FRACCIONES H, S, P, PrH y PrS.

Recordemos que recientemente, Tephly (1975) reportó la identificación de una molécula de bajo peso molecular aislada del citosol de hígado de rata, que poseía un efecto protector sobre la inhibición por el plomo de la Deaminasa de eritrositos de aves, y posteriormente, Piper y van Lier (1977) sugirieron que ese factor protector podría ser una molécula del tipo de los derivados del pteroilpoliglutamato, de manera que podría lograrse un efecto análogo empleando como sustituto de esa molécula protectora el ácido fólico.

Con el objeto de determinar si podía haber alguna relación entre el factor protector de Tephly y nuestros factores, considerando que los F_H y F_S serían mejores representantes del factor real presente en Euglena que los Hø y Sø, y además que el comportamiento de ambos, sugeriría que se trata del mismo compuesto, comenzamos por llevar a cabo una serie de experiencias en las cuales se ensayó paralelamente la acción de F_S y diferentes concentraciones de ácido fólico. En la Figura 122 se muestran los datos obtenidos representando aquellas concentraciones de fólico que produjeron mayores efectos cuando los hubo y además estaban dentro del orden del producido por el F_S. Como ya se había en-

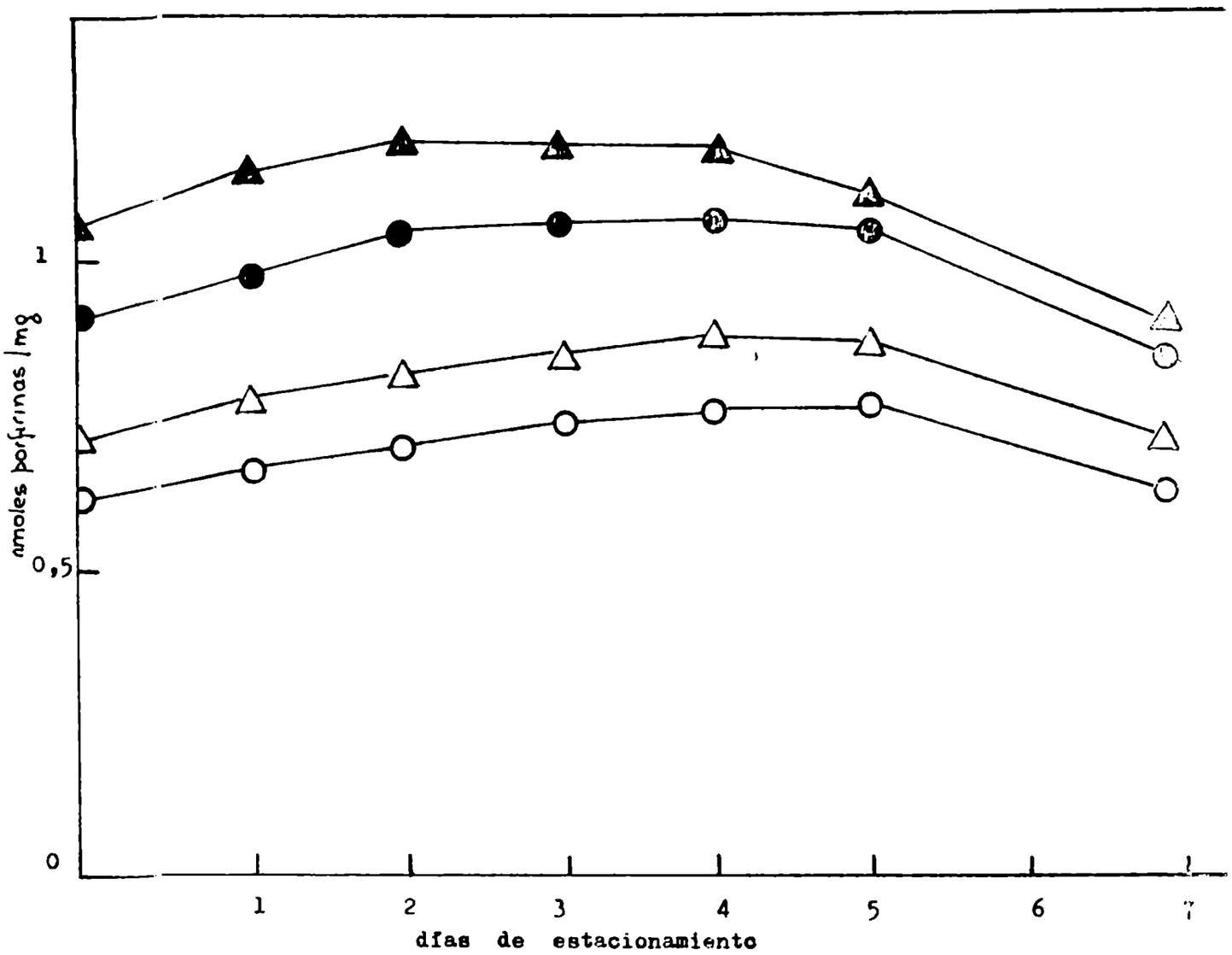


Figura 121: Efecto del tiempo de estacionamiento de las fracciones PrH (o), PrS (▲) FH y FS, guardadas en heladera, entre 4-6 °C. A los tiempos indicados se tomaron muestras de cada una de ellas y se determinó actividad enzimática. Las condiciones experimentales fueron las standard, excepto que para las mezclas PrH + FH (o) y PrS + FS (▲), la relación fue de 1:0,5 (ml:ml).

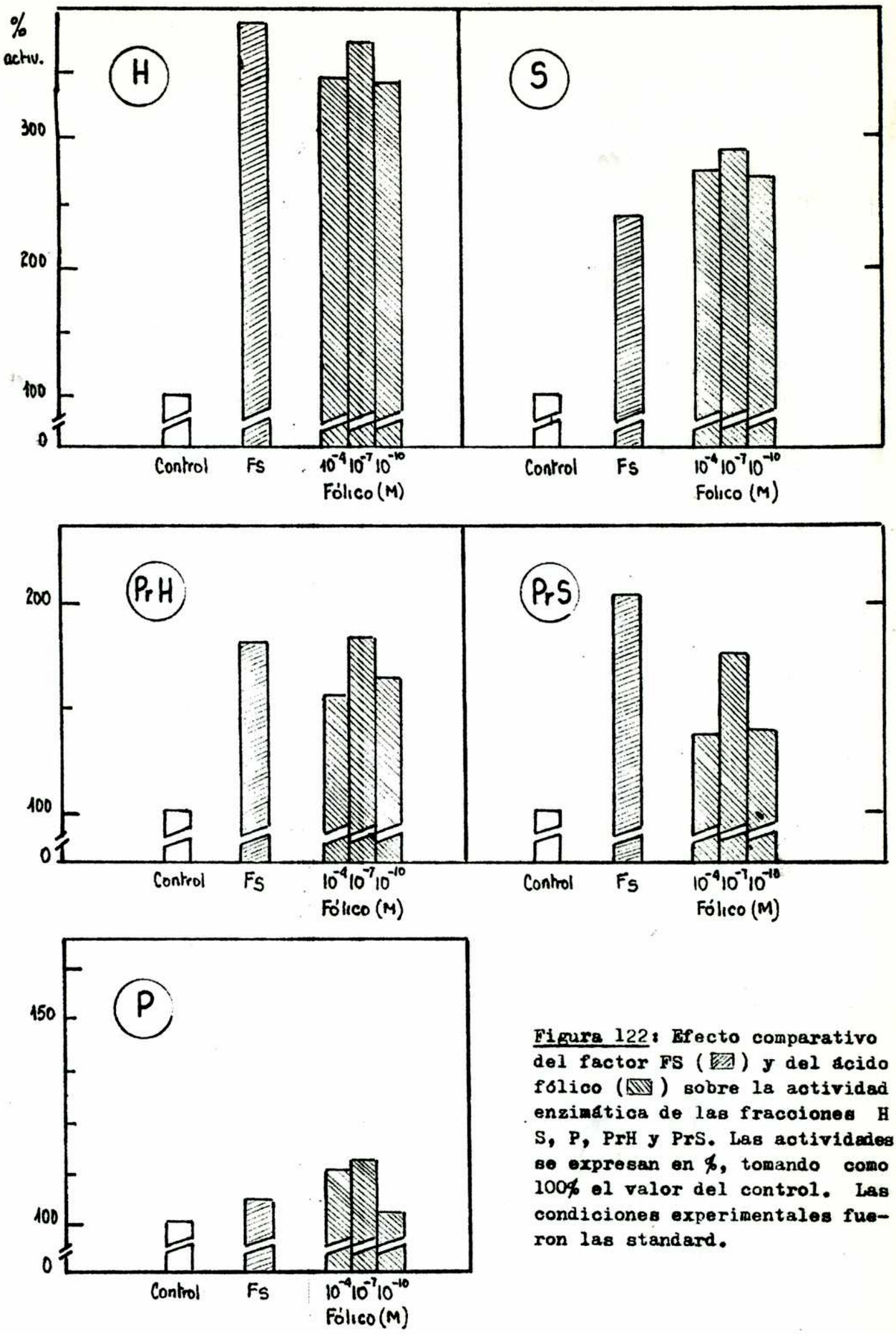


Figura 122: Efecto comparativo del factor FS (▨) y del ácido fólico (▧) sobre la actividad enzimática de las fracciones H S, P, PrH y PrS. Las actividades se expresan en %, tomando como 100% el valor del control. Las condiciones experimentales fueron las standard.

Tabla XLII : Termoestabilidad de los factores F_H y F_S

Sistema de incubación	nmoles porfirinas / mg proteina	ug PBG cons / mg proteina	actividad relativa	unidades arbitrarias
H	0,03417	0,48253	----	----
S	0,03878	0,7582	----	----
PrH	0,3237	1,9452	9,5	----
PrH + F_H	0,8490	3,5631	2,6	1,30
PrH + F_H 10'	0,8904	3,6018	2,7	1,35
PrH + F_H 20'	0,7882	3,5766	2,4	1,20
PrH + H Ø	0,3238	1,9556	1,0	----
PrS	0,3975	3,6811	10,2	----
PrS + F_S	0,8528	3,8346	2,4	1,20
PrS + F_S 10'	0,9660	3,7368	2,4	1,20
PrS + F_S 20'	0,8128	3,9320	2,1	1,05
PrH + S Ø	0,3401	1,9890	1,05	----

Las condiciones experimentales son las standard o las detalladas en la Tabla XL y XLI. F_H y F_S 10' y 20' se obtuvieron calentando la misma preparación empleada como control de su acción, en baño de agua a 100°C , con agitación, a los 10 minutos se retiró el volumen necesario y a los 20 minutos el resto, enfriándose en ambos casos inmediatamente en baño de hielo.

contrado F_S activa varias veces (aquí entre 2,5 y 4) la actividad de S y H, alrededor del doble de la de los PrH y PrS y prácticamente (1,05 veces) no modifica pellet. En todos los casos el máximo efecto de fólico se logró a una concentración de 10^{-7}M. Estos datos, por un lado podrían hacernos pensar que el factor sería o contendría en su composición una molécula del tipo del fólico, sin embargo, no concuerdan con los resultados de Tephly en el sentido de que, en ese caso, el agregado de fólico produjo una estimulación máxima del 20-25% (acá es cerca del 400%) a una concentración de 10^{-4}M.

También proponían esos autores, como recordamos, que este factor actuaba protegiendo a la enzima de la inhibición por plomo. Son varias las PDGasas y Deaminasas de diverso origen que se inhiben por plomo (Llambías y Batlle, 1971a,b.; Sancovich et al, 1969a, 1977; Frydman y Feinstein, 1974) y también sabemos que la naturaleza sulfhidrílica de estas enzimas; pero aunque se ha estudiado el efecto de varios reactivos sobre las enzimas de Euglena no sabíamos todavía cuál sería su comportamiento sobre el plomo. Se usó acetato de plomo, no solo por su mayor solubilidad, sino que de experiencias previas se había determinado que los aniones acetato no afectan la actividad. Sobre H, S, P, PrH y PrS se ensayaron concentraciones de plomo desde 10^{-3} a 10^{-6}M y de los datos de la Tabla XLIV, salvo en los casos de sobrenadante a casi todas las molaridades y de pellet a las menores, en los cuales se encontró un ligero aumento, pero que no consideramos significativo, el plomo parece no afectar las enzimas de Euglena, podríamos pensar que, en H y S hubiera suficiente factor como para protegerla de la acción del plomo; pero no creemos que haya factor en pellet o si lo hay debe estar en muy baja proporción. Y tanto de PrH como de PrS, pensamos que el factor F_H o F_S ya fué separado por filtración en G-25. De manera, que si bien el ácido fólico podría tener alguna relación con nuestro factor, desde ya no sería un factor protector del tipo descripto por Tephly, sino decididamente un factor regulador y estimulante de la actividad enzimática.

IV.- 6.- EFECTO DEL FACTOR F_S y el GLUTATION REDUCIDO.

De acuerdo con experiencias previas de nuestro laboratorio sabemos que las PDGasas y Deaminasas de distinto origen se afectan en un sentido u otro por la acción de compuestos tiólicos diversos. Ya en 1969, Sancovich et al habían encontrado evidencias que en la PDGasa de hígado bovino podría existir un factor dializable y ultrafiltrable que por reconbinación con la enzima modificaba su actividad. Se pensó entonces en que podría ser algún derivado sulfhidrílico, pero el fenómeno no se investigó en profundidad. A pesar de que el mismo Tephly (1975) comenta que su factor protector no tendría grupos tioles, nosotros sospechamos que en este caso, ya sea como parte de la composición misma de este factor regulador o quizás, en favor de la opinión de Tephly, involucrados en el sitio de interacción con el factor, o aún todavía ambas estructuras, deben estar implicados restos sulfhidrílicos. De ser así, quizás habría alguna similitud entre los efectos del factor y por ejemplo, los del glutation reducido. Se ensayaron entonces distintas concentraciones del tiol y en la Figura 123 se ilustran el comportamient

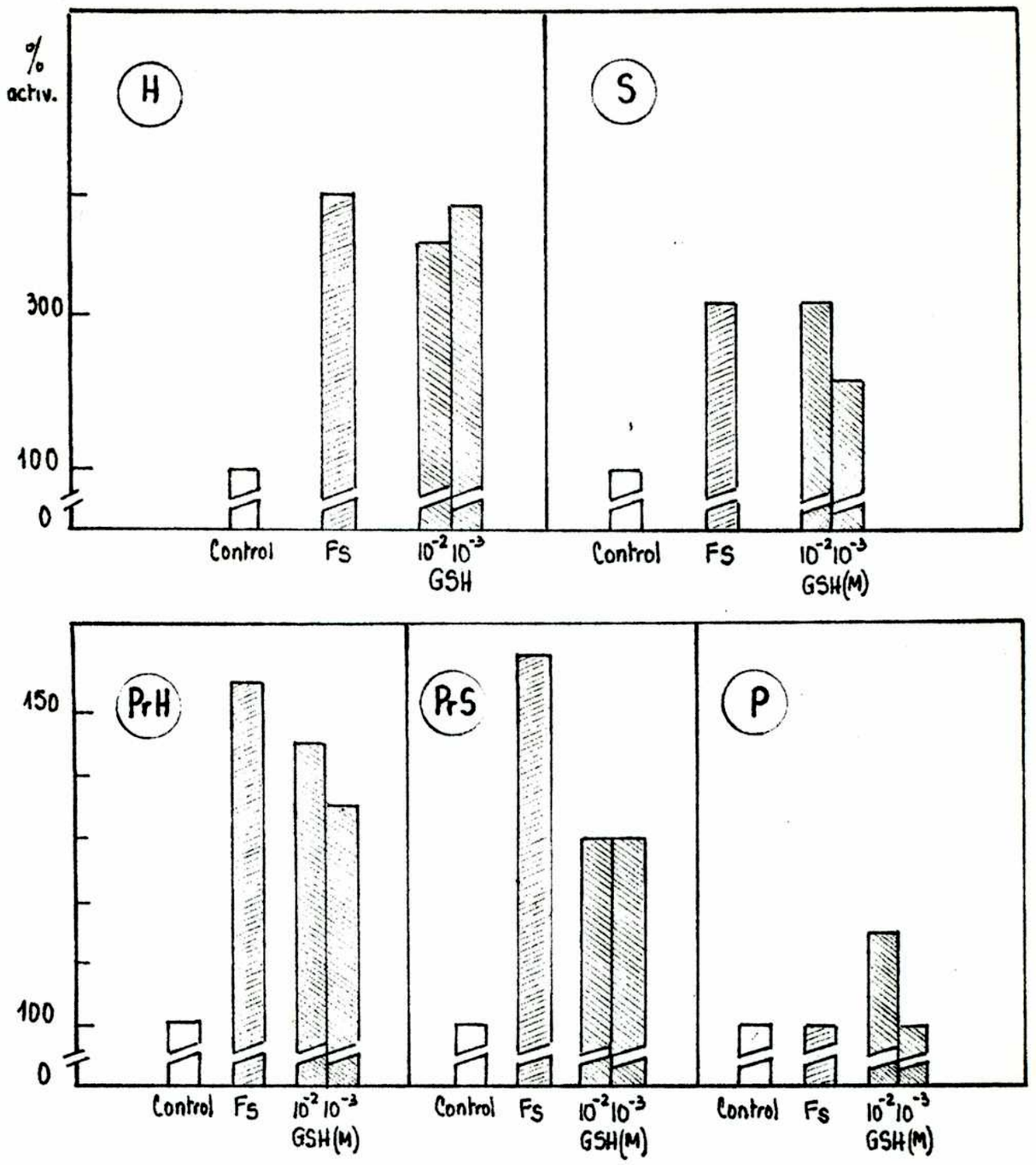


Figura 123: Efecto comparativo de la acción del factor FS ( ) y del Glutatión reducido (GSH) ( ), sobre la actividad enzimática de las fracciones H, S, P, PrH y PrS. Los valores se expresan en porcentajes relativos, tomando como 100% el del control.

del F_S y de las dos concentraciones de GSH que produjeron los efectos máximos y más cercamos a los del factor. excepto con pellet, a GSH 10^{-2}M, que apenas estimuló un 15%, en todos los demás casos, el factor incrementó la actividad en la forma esperada y ya comentada, y el GSH, también produjo aumentos prácticamente delmismo orden (excepto en PrS) que el factor S.

Tampoco podemos asegurar en base a estos resultados, si el factor es un derivado sulfhidrílico o no; si modifica favorablemente la conformación del sitio activo, actuando como un efector alostérico positivo, si facilita la asociación de las dos enzimas de la PBGasa, a través de la formación de un complejo activo en el cual ciertos residuos SH son requisitos importantes; lo que es evidente, es que el efecto visible de la acción es también muy parecido sino idéntico al obtenido con GSH.

IV.- 6.- EFECTO DE LOS FACTORES F_H Y F_S, ACIDO FOLICO, ACETATO DE PLOMO Y GLUTATION REDUCIDO SOBRE LA PBGasa LIBERADA.

Finalmente, ha sido un hecho muy llamativo que los factores F_H y F_S no ejercieran efecto alguno sobre la fracción pellet, de manera que en un intento para lograr alguna evidencia que nos permitiera explicar las razones de este comportamiento diferencial del pellet frente al factor, se decidió liberar la PBGasa de pellet, con el método desarrollado y discutido en la sección referente a su purificación a partir de esta fracción, es decir usando un agente caotrópico, como el SCN^- y ensayar el efecto de los factores F_H, F_S, fólico, plomo y GSH sobre la enzima liberada.

Losresultados obtenidos se muestran en la Tabla XLIV, confirmado una vez más que F_H y F_S no alteraban la actividad del pellet, tampoco lo hicieron con la PBGasa libre, lo mismo sucedió con fólico y GSH y con el plomo; podría decirse que por el contrario hubo una muy ligera inactivación que no consideramos significativa. Aparentemente, la enzima de pellet o no tendría los sitios receptores adecuados para que el factor pudiera actuar, o ya ha adoptado una configuración tal que es la que corresponde para una máxima expresión de su actividad. Notemos que la sola separación de la enzima de la membrana, aumenta 31 veces su actividad; y análogamente, los efectos de los F_H y F_S sobre las proteínas PrH y PrS, que eran entre 10 y 15 veces más activas que sus respectivos H y S, eran mucho menores, que sobre H y S. Así, parece haber entonces también cierta relación entre la acción del factor y la actividad relativa de la misma enzima.

IV.- 7.- MECANISMO PROPUESTO PARA LA LIBERACIÓN Y ACCION DEL FACTOR REGULADOR DE LA ACTIVIDAD DE PBGasa EN EUGLENA GRACILIS.

Aeptamos que aún estamos en las etapas iniciales del estudio de un atrayente fenómeno. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos, es posible postular un mecanismo para la liberación y forma de acción de este factor que estamos seguros juega un papel importante, no sólo en la conversión enzimática del PBG en porfirinógenos, sino probablemente en la regulación misma de la biosíntesis de porfirinas.

Tabla XLIII : Efecto del acetato de plomo sobre la actividad de varias fracciones enzimáticas

Sistema de incubación	nmoles porfirinas / mg proteina	µg PBG cons / mg proteina	actividad relativa
H	0,0295	0,4989	---
S	0,0542	0,7308	---
P	0,0877	0,5450	---
PrH	0,4311	2,0723	14
H + Pb 10^{-3} M	0,0284	0,5035	9
10^{-4} M	0,0301	0,5028	1,01
10^{-5} M	0,0280	0,4943	0,95
10^{-6} M	0,0284	0,5025	0,96
S + Pb 10^{-3} M	0,06567	0,7221	1,20
10^{-4} M	0,06816	0,7229	1,25
10^{-5} M	0,05478	0,7150	1,01
10^{-6} M	0,0652	0,7241	1,20
P + Pb 10^{-3} M	0,0861	0,4772	0,98
10^{-4} M	0,0964	0,5557	1,10
10^{-5} M	0,1056	0,4862	1,20
10^{-6} M	0,1045	0,4564	1,20
PrH+ Pb 10^{-3} M	0,41977	1,8366	0,97
10^{-4} M	0,30892	1,8435	0,95
10^{-5} M	0,3841	1,5322	0,90
10^{-6} M	0,3791	1,6210	0,90
PrS+ Pb 10^{-3} M	0,4197	1,8366	0,97
10^{-4} M	0,4455	1,9094	0,98
10^{-5} M	0,4538	1,7438	0,99
10^{-6} M	0,3974	1,8299	0,90

La actividad relativa se calculó en base a los datos de porfirinas como se detalla en la Tabla XLI. Las concentraciones de Pb son las finales en la mezcla de reacción. El resto de las condiciones experimentales son las standard ó las descriptas en la Tabla XL ó XLI.

Tabla XLIV : Efecto de los Factores F_H y F_S, ácido fólico, acetato de plomo y glutation reducido sobre la PBGasa liberada de pellet.

Sistema de incubación	nmoles porfirina / mg proteina	µg PBG cons / mg proteina	actividad relativa
P	0,0834	0,5192	
P + F_H	0,0864	0,7639	1,03
P + F_S	0,0871	0,8120	1,04
P_{SCN-}	2,599	4,0828	31,00
P_{SCN-} + F_H	2,234	5,2329	0,86
P_{SCN-} + F_S	2,305	5,6456	0,89
P_{SCN-} + Fólico 10^{-7} M	2,212	3,7600	0,85
P_{SCN-} + Pb 10^{-3} M	2,270	3,7709	0,87
P_{SCN-} + GSH 10^{-2} M	2,622	4,0020	1,01

La enzima se liberó del pellet, por tratamiento con SCN- de acuerdo al método descripto en la sección II de Resultados (P_{SCN-}). El resto de las condiciones experimentales son las standard o descriptas en las Tablas XL, XLI, Las concentraciones de fólico, acetato de plomo y glutation indicadas son las finales en la mezcla de reacción.

Según nuestro esquema (Figura 124), el factor F se encontraría normalmente asociado a la forma soluble de la enzima, que sería la que poseería propiedades regulatorias, constituyendo una especie molecular de baja actividad; sin embargo, a causa por ejemplo, de ciertas demandas fisiológicas "in vivo", o una vez roto el tejido, el factor podría liberarse más o menos rápidamente, según las condiciones y composición del medio. Nosotros suponemos que debe existir un equilibrio entre las formas E:F ⇄ E + F, que estaría desplazado hacia un lado u otro, de acuerdo con el estado de la célula. El factor, una vez libre podría adquirir capacidad para manifestar sus propiedades activadoras, al parecer, sin embargo, solamente sobre la enzima soluble, pues recordemos que esta molécula, podía estimular varias vecesila actividad del homogentato, del sobrenadante y también aunque en menor grado, de las proteínas del homogentato y del sobrenadante (PrH y PrS); pero no mostraba efecto alguno sobre la enzima unida a pellet.

Si bien no podemos explicar con certeza, cuál es el mecanismo de liberación y conversión de ese compuesto regulador, en una molécula activante, podríamos especular asumiendo que el factor estaría unido a la proteína por medio de enlaces no covalentes, a través de determinados residuos, dando como resultado una estructura molecular comprimida ("constrained") de baja actividad por razones de necesidad celular; o como dijimos, al romper la célula y separar la enzima, llevándola a un medio más diluído, el factor se disociaría fácilmente de la proteína, (recordemos que por simple estacionamiento, las soluciones de H y S se activan espontáneamente); como consecuencia, se expondrían los grupos funcionales involucrados en dicha asociación, tanto sobre la proteína enzimática como en el factor; éste ahora, quedaría en libertad de ejercer su efecto estimulante, por un mecanismo que convirtiera a la enzima libre activa en una forma de actividad aún más alta. ¿Cómo? Siguiendo con nuestras teorías, es probable que el factor así separado poseyera ahora alguno o varios grupos funcionales libres, capaces de interactuar específica y más eficientemente con ciertos residuos de aminoácidos de la enzima soluble, produciendo determinados cambios conformacionales en la estructura proteica que a su vez la convirtieran en una forma de máxima actividad catalítica; paralelamente podría ocurrir que también la protegiera de la acción de ciertos inhibidores impidiendo o interfiriendo con la entrada a su sitio de unión que tal vez fuera el sitio activo o bien un sitio alostérico.

El hecho de que el factor no actúe sobre la enzima particulada, nos hace pensar que es muy probable que los sitios receptores de una u otra forma activa del factor regulador, deben estar bloqueados, tal vez embebidos en la membrana. Si al separar la proteina de pellet, consecuentemente se expone estos sitios, podría suceder que la enzima ya existiera en una configuración espacial óptima de manera que no cabría esperar un aumento adicional de su actividad por la acción del factor; otra posibilidad es que el factor agregado se uniera alternatimanete a uno u otro sitio receptor, produciendo una mezcla de especies más activas y otras menos activas y en consecuencia no se detectarían cambios en la actividad del conjunto.

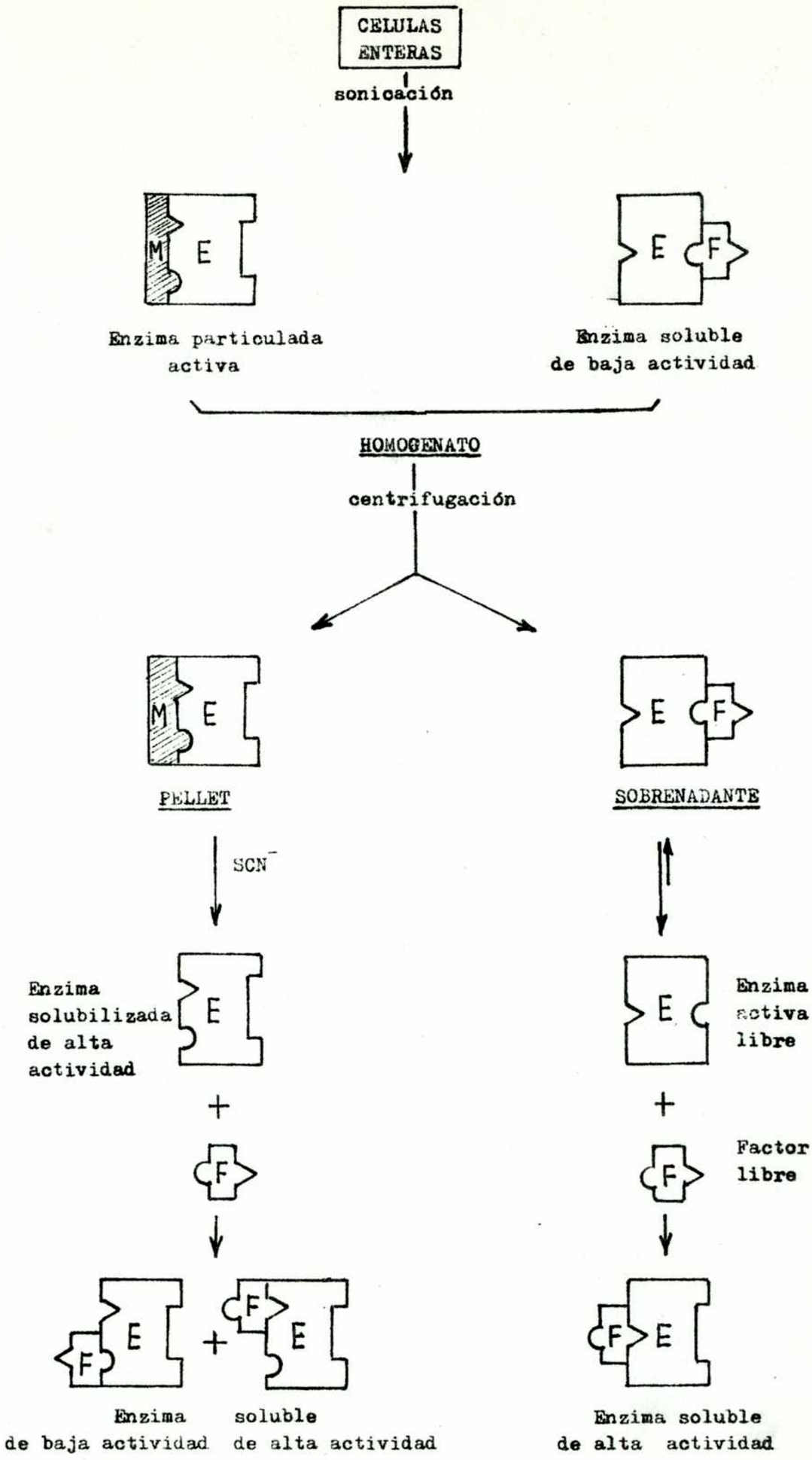


Figura 124: Mecanismo propuesto para la liberación y activación del factor regulador de la actividad de PBGasa en *Euglena gracilis* .M= membrana; E = enzima; F = Factor Regulador

V.- MECANISMO DE ACCION DE LA CICLOTETRAMERIZACION ENZIMATICA DEL PORFOBILINOGENO EN UROPORFIRINOGENOS.

Teniendo en cuenta todas las evidencias experimentales descriptas y comentadas al comienzo de esta Tesis y los nuevos aportes que han surgido de estos estudios, se ha de proponer un mecanismo que explique la naturaleza del proceso biosintético que lleva finalmente a la síntesis enzimática de los Uroporfirinógenos a partir del PBG.

Todavía no se ha logrado demostrar si la Isomerasa es una enzima que actúa complementando o modificando el modo de acción de la Deaminasa, o si tiene la función de una transferasa; pero es un hecho indiscutible, que se han detectado, aislado, identificado y aún sintetizado química y biosintéticamente intermediarios polipirrólicos de longitud variable, algunos de los cuales llevan a la formación del isómero III, en tanto que otros no. Parecería entonces una conclusión obvia que la etapa de isomerización tendría lugar en el comienzo mismo de la condensación, aunque hay ahora algunas dudas al respecto; sin embargo el mayor cúmulo de datos experimentales están de acuerdo con esta premisa, que en consecuencia es uno de los primeros o el primer hecho que debemos enfatizar en el mecanismo propuesto (Figura 125).

En 1971 (Llambías y Batlle, 1971a) habían postulado un esquema que tenía en cuenta el hecho de que la reacción de isomerización era una etapa temprana en la secuencia de la polimerización del PBG, sin embargo ese mecanismo necesita modificarse en vista de los nuevos e interesantísimos resultados obtenidos a posteriori. Recordemos que el anillo D debe representar el comienzo de la reacción (Battersby et al, 1973), por ende, debe ser el primero en unirse a la enzima.

En 1971 habíamos propuesto que la primer molécula de PBG se unía a la Deaminasa a través de sus dos sustituyentes carboxílicos y su posición libre. La Deaminasa catalizaría luego la formación de un dipirrol con la segunda molécula de PBG, a partir del cual se originaría un tripirrol lineal, que ya poseería la estructura de la serie III, por acción combinada de la Isomerasa. Como se dijo entonces, sobre la base de resultados preliminares que sugerían que los intermediarios polipirrólicos aislados naturalmente eran tripirranos, la Isomerasa funcionaría en una etapa posterior a la formación del dipirrol, pero antes de la inserción de la última molécula de PBG, si bien no se excluía si no más aún, se consideraba posible, que la Isomerasa actuara en una etapa todavía anterior, es decir durante la formación del dipirrol (Llambías y Batlle, 1971a,b).

Ahora parecería que no existen intermediarios pirrilmetanos comunes a los Uroporfirinógenos III y I, de manera que la unión y reacción inicial de las dos primeras moléculas de PBG debería ser necesariamente diferente según se tratara de la PBGasa o de la Deaminasa. En base a estas consideraciones, el esquema básico que propusiéramos en 1971, no requiere modificaciones, pero sí la línea que seguía el curso de acción de la PBGasa. Hoy disponemos de bastante más información acerca de la Isomerasa.

Así, consideramos que en presencia de ambas enzimas, Deaminasa e Isomerasa, primero debe formarse un complejo entre ambas como etapa previa de la reacción; esa asociación entre la Deaminasa y la Isomerasa debe ocurrir en una relación 1:1, puede tener lugar independientemente de la presencia de ningún sustrato, no es necesariamente una unión muy fuerte y podían estar involucrados grupos tioles, aunque sería posible que hubiera otro tipo de uniones; tal vez a este nivel actuara algún factor regulador si lo hubiera, según el organismo o el tejido en cuestión.

Inmediatamente después de la formación inicial del complejo Deaminasa: Isomerasa, la primer molécula de PBG, correspondiente al anillo D se une al complejo enzimático, muy probablemente a través de sus sustituyentes β-carboxílicos y su posición α libre, con el componente Deaminasa y a través de su grupo α aminometilo también con la isomerasa. El sitio de unión del restometileno a la Isomerasa, necesariamente debe ser un buen grupo nucleofílico capaz de desplazar el grupo amino del sustituyente α-aminometilo del PBG, para que ocurra esta unión inicial. Esta unión puede tener lugar a través de nitrógenos núcleofílicos de restos aminos o imidazólicos sobre la enzima.

En presencia de una segunda molécula de PBG, la Isomerasa actúa modificando el sitio de condensación y determinando que tendría lugar sobre el extremo metileno-enzima de la cadena, en esta forma el resultado de la condensación y el reordenamiento de las dos primeras moléculas de PBG, produciría un dipirrol, cuya estructura correspondería muy probablemente a un PAAP o UPH III. En ausencia de la Isomerasa debe ocurrir una condensación normal cabeza a cola, que produciría el dipirrilmetano I (DPM I), no isomerizado PAPA.

Después de esta etapa, en cada condensación ocurriría la inserción de una molécula intacta de PBG. Cuando la cadena alcanza la longitud crítica, correspondiente a un tetrapirrol, tendría lugar la ciclización.

Estudiando modelos moleculares de di y tripirrilmetanos en cuanto a impedimentos estéricos, sobre su comportamiento, Dalton y Dougherty (1969) observaron que los anillos pirrólicos de un dipirrilmetano no pueden rotar libremente alrededor de sus uniones sobre el puente metilénico común, sugiriendo entonces que cada nueva unidad de PBG, debería agregarse a la cadena en crecimiento en una conformación rotacional conveniente para que pueda ocurrir finalmente la ciclización a Uroporfirinógeno; es decir con su nitrógeno pirrólico adyacente al nitrógeno de su pirrol vecino; en el esquema aquí propuesto se ha adoptado esa geometría y además se han tenido en cuenta otras consideraciones, acerca de los cuales no vamos a extendernos, sobre la conformación cíclica de los supuestos precursores (Franck et al, 1976).

Después de la ciclización se separarían las enzimas Deaminasa e Isomerasa que para iniciar un nuevo ciclo deberían comenzar por volver a asociarse. El mecanismo propuesto está de acuerdo con todas las evidencias experimetaletes disponibles al presente, de acuerdo con esta secuencia, el intermediario tetrapirrólico de una síntesis normal correspondería a un tetrapirrilmetano isomerizado

PAAPAPAP y el proveniente de la Deaminasa a un PAPAPAPA, acerca de los cuales, este trabajo ha provisto nuevos aportes. Sin embargo, son todavía necesarios tanto una rigurosa caracterización de esos intermediarios naturales, así como estudios adicionales con nuevos polipirroles sintéticos y las enzimas involucradas en esta reacción, para encontrar la verdadera solución al siempre intrigante problema, de por qué los derivados porfirínicos producidos biológicamente pertenecen a la serie III.

Afortunadamente, al final de esta etapa hemos encontrado muchas respuestas a nuestros interrogantes y al mismo tiempo se nos han planteado nuevas inquietudes, ello significa que el campo de la investigación siempre es fértil y bien sembrado, los resultados que recojamos sólo dependen de nosotros mismos.-

RESUMEN

Los resultados y conclusiones obtenidos en este estudio sobre la conversión enzimática del PBG en porfirinógenos empleando células de Euglena gracilis, pueden resumirse, encuandrandolos dentro de los mismos capítulos, en los cuales se ha dividido la Sección Experimental.

I. Estudios preliminares:

Los primeros ensayos tuvieron como objeto determinar las condiciones más convenientes para detectar, extraer y medir la actividad enzimática.

Empleando células de Euglena crecidas en la luz, se extrajo la proteína enzimática por homogeinización y se separaron una fracción sobrenadante (S) y un pellet (P), por centrifugación. Se estudió la influencia de la atmósfera de incubación sobre la formación de porfirinas, encontrándose que la reacción era necesariamente anaeróbica para Homogenato (H) y D, y ocurría indistintamente en presencia o ausencia de aire para P. Además se apreció que el 60% de la enzima pasa al S y el resto estaba asociada a P.

Se establecieron las condiciones óptimas en cuanto a la técnica de homogeinización, selección de buffer de extracción y de incubación y la relación de peso de células a volumen de buffer durante la extracción. Se determinó que la técnica de sonicación, aplicada durante 30 segundos, en uuna suspensión de células en buffer de fosfato 0,05M pH 7,4, en la relación 1 gm de células : 2 ml de buffer y luego incubación en el mismo buffer eran las óptimas.

Se podían emplear las células cosechadas directamente sin lavar y era indistinto partir de inóculos de agar crecidos en luz u oscuridad para el posterior desarrollo de cultivos de Euglena en la oscuridad en medio líquido .

Se llevaron a cabo una serie de controles en cuanto a la metodología empleada; para la separación cuantitativa de los productos formados enzimaticamente, y para la medición del sustrato.

Se investigó el efecto del agregado de ciertas sales a la mezcla

a la mezcla de incubación, con el objeto de hallar una forma de inhibir las Decarboxilasas presentes en H y S, y al mismo tiempo estimular la actividad de PBGasa, sin los resultados esperados.

Fue importante determinar cuáles eran los efectos de la iluminación y los días de crecimiento, sobre la actividad enzimática, crecimiento, contenido proteico y de clorofila. Se estableció, que tanto en luz como en oscuridad, la actividad específica no mostraba cambios significativos con los días de crecimiento, si bien el día 4to y en oscuridad parecían ser las variables más convenientes a emplear para el desarrollo y cosecha de las células. El contenido proteico respondió a un modelo normal y en cuanto a la clorofila, considerando la cantidad total formada, se incrementó con el tiempo, y era mayor, lógicamente en luz que en oscuridad; sin embargo, expresando la cantidad de pigmento en base a contenido proteico, no varió demasiado con el tiempo, pero sí se mantuvo su superioridad en células iluminadas.

Se llevó a cabo un estudio extenso, comparativo, en cuanto a actividad, contenido proteico y de proteína y distribución celular; empleando células frescas crecidas en luz y oscuridad y sus correspondientes polvos cetónicos. En resumen, las condiciones de iluminación no parecen influir significativamente sobre la actividad; sin embargo, la distribución de la enzima es diferente según provenga de células frescas o polvos cetónicos, en las primeras, la mayor cantidad de PBGasa está en pellet, en cambio, en polvo cetónico, pasa preferentemente al Sobrenadante, pero acompañada de Decarboxilasas. Si bien los polvos cetónicos resultaron muy estables, para los propósitos de este trabajo, cuando se trate de seleccionar la fuente más rica y menos impurificada de PBGasa, lo más conveniente es usar tejido fresco.

Se determinó el pH óptimo de la reacción, cuando la actividad se expresó en función de las porfirinas formadas, se encontró un pH óptimo bien definido a 7,4 si en cambio se refiere a la cantidad de sutrato consumido,se revelaron dos pH óptimos, uno entre 6,9 - 7,0 y un segundo, más ancho, entre 8 y 9.

Se llevaron a cabo las curvas de saturación se sustrato, la reacción de formación de porfirinas, mostró una cinética michaeliana, con un Km de $1,3 \times 10^{-5}$ M y un n de Hill de 1; en cambio la curva de consumo de sustrato llamativamente reveló la existencia de interacciones homotrópicas positivas, su perfil fue sigmoideo, el n de Hill tendía a 2; pero el Km fue igual al determinado midiendo la formación

de producto. Asimismo fue evidente la falta de estequiometría en la reacción, a concentraciones de PBG superiores a10 μM.

Los resultados obtenidos estudiando la influencia de la cantidad de pr teína enzimática sobre la actividad, revelaron un aumento lineal de la cantidad total de porfirinas formadas con cantidades crecientes de proteínas y en consecu cia actividad específica constante; en cambio, el consumo total de PBG aumentó hasta un cierto valor máximo y luego, por más que aumentó la proteína permaneci constante, correspondientemente la actividad específica disminuyó, hasta un valo determinado, con cantidades crecientes de enzima.

El estudio del efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de di tintas fracciones a diferentes atmósferas, reveló tempranamente, una etapa más l ta, parecida a un lag, y luego una formación más rápida de porfirinas; en cuanto perfil de PBG remanente, no hubo estequiometría, sugiriéndose fuertemente que du te la reacción se debían estar formando intermediarios polipirrólicos, que parec acumularse principalmente durante la primera fase lenta del proceso.

II. Ensayos de purificación de la enzima: Seleccionando como fuente de partida, célul de *Euglena* crecidas en la oscuridad y cosechadas al 4to día de desarrollo, se pr pararon las fracciones H, S y P en la forma standard; empleándose las dos última para la purificación de la PBGasa, Deaminasa e Isomerasa.

Se desarrolló un procedimiento para la purificación de la PBGasa de sol nadante, que permite obtener una preparación no totalmente liberada de la Decarb lasas; alrededor de 700 veces más activa, que producía 70% de Uro III y 30% de p firinas decarboxiladas, y que por cromatografía en Sephadex G-100, le correspond un Peso Molecular de 50000, en tanto que a través de Sepharosa, dió dos picos, d 70.000 y 50.000 de Peso Molecular.

Usando la fracción pellet como fuente de PBGasa, se tiene la ventaja d que tiene solo actividad del complejo, no estando contaminada con Decarboxilasas el único problema era seleccionar la técnica más conveniente para separar las en zimas de la membrana. Para ello, se aplicó con exitó la extracción con un agent caotrópico como el sulfocianuro de sodio. Una vez liberada se aplicó una secuen cia de purificación semejante al caso anterior, obteniéndose una preparación alt mente, purificada con actividad exclusiva de PBGasa, que producía 100% de Uro III, por Seph

dex G-100 dió una banda principal de Peso Molecular 50.000 y un lomo alrededor de los 25.000; En Seoharosa, se revelaron dos picos muy bien definidos de 50.000 y 25.000; sugiriéndo estos resultados, que en la PBGasa de Euglena, parecían existir en equilibrio dos especies moleculares activas.

La Deaminasa se purificó también a partir de Sobrenadante y de Pellet, utilizandose como método más eficiente para la separación de la Deaminasa del complejo de la PBGasa, el calentamiento de una solución conteniendo esta enzima, aprovechándose la conocida termoestabilidad de la Isomerasa y también de las Decarboxilasas, que son abundantes en la fracción Sobrenadante.

Se desarrollaron dos procedimientos para la purificación de la Deaminasa ya sea a partir de S o de la proteína liberada de pellet con sulfocianuro. En ambos estaba incluida la etapa de calentamiento, y la mayor diferencia residió en un tratamiento previó con ácido acético glacial a pH 5,0. Con cualquiera de las secuencias y utilizando el Sobrenadante o el Pellet, se logró obtener una preparación de Deaminasa purificada de 1200 a 1400 veces, que producía 95 a 100% de Uro con un Peso MOlecular de la especie activa dominante de 40.000, acompañada en algunos casos de un cierto porcentaje, no mayor del 25% de una forma de Peso Molecular de 20.000.

A partir de la fracción Sobrenadante de homogenato, con o sin tratamiento con ácido ácético, se desarrolló un procedimiento para la purificación del componente Isomerasa, que se concentra principalmente en un precipitado de sulfato de amoniode 80-90% de saturación. Las cromatografías de estos preparados, revelaron que la Isomerasa de Euglena, cuando se encuentra aislada en solución, presenta una fuerte tendencia a la agregación, siendo la especie predominante, la de Peso Molecular 30.000; pero en determinadas condiciones se revelan especies de pesos moleculares menores, 15.000; 10.000 y 5.000. Se ha propuesto que la subunidad de la Isomerasa es un polipéptido de Peso Molecular 5.000.

En base a los datos obtenidos en este trabajo, y de un análisis de la información disponible acerca de los valores de pesos moleculares de la PBGasa, Deaminasa e Isomerasa en otros tejidos, se ha postulado que la especie molecular mínima funcional ó monómero de la PBGasa está contituida por una subunidad de Deaminasa de Peso Molecular 20.000 y una subunidad de Isomerasa de Peso Molecular

5.000, de manera que su correspondiente Peso sería de 25.000.

Se ha propuesto un esquema para la formación del monómero de la PBGasa, al mismo tiempo que explicar la existencia de monómeros, dímeros y tetrámeros activos en diferentes tejidos. De acuerdo a ello, en algunos casos ese monómero sería la especie funcionàlmente activa, como para la PBGasa de callos de soya; en hígado bovino la PBGasa sería un dímero de Peso Molecular 50.000; en tanto en Euglena, la especie principal sería un dímero en equilibrio con el monómero y para eritrocitos habría una PBGasa tetramérica.

III. Intermediarios polipirrólicos en la ciclotetramerización enzimática del PBG:

Por acción del PBG sobre la PBGasa de pellet y la Deaminasa de Euglena se obtuvieron evidencias acerca de la formación de intermediarios polipirrólicos, bajo condiciones normales, en anaerobiosis.

Se encontró sin embargo, que la actividad de la PBGasa de pellet, no se afectaba por la presencia de aire; en rendimiento en porfirinógenos fué el mismo bajo atmósfera aeróbica ó aneróbica. Tanto en el caso del pellet como de la Deaminasa, en la curva de tiempo se observaron dos fases durante la síntesis de porfirinógenos, una lenta y una más rápida, sugiriéndose que en la reacción debían estar formándose algunos intermediarios polipirrólicos.

Los resultados obtenidos, indicaron claramente que los polipirroles formados por la PBGasa y la Deaminasa eran diferentes y fueron designados P y D-pirroles respectivamente. De un estudio de su interacción con las enzimas, empleando técnicas de marcación directa y de dilución isótopica, se demostró que no se comportaban como sustratos, sino como intermediarios en la reacción, inhibiendo además, significativamente, la formación total de uroporfirinógenos.

Se postuló entonces, que estas soluciones de intermediarios debían contener un alto porcentaje de polipirroles de cadena más larga que competían muy ineficientemente por su sitio de unión con los intermediarios unidos a la enzima.

Esta hipótesis fue confirmada con los datos obtenidos empleando cantidades variables de los polipirroles P y D libres, agregados a las distintas enzimas. Como se esperaba cantidades crecientes de los intermediarios libres, aumentaron correspondientemente la inhibición total de los porfirinógenos formados, y también produjeron un efecto significativo sobre su composición isómerica. Con las enzimas de Pellet, tanto el P como el D-pirrol aumentaron el porcentaje del

tipo I.

Los datos experimentales,sugerían que la polimerización enzimática del PBG tiene lugar en una secuencia "non stop" sobre la superficie de la enzima; de manera que como hipótesis de tr-abajo aceptamos que los posibles intermediarios deben permanecer unidos a la enzima, hasta que la cadena polipirrólica en crecimiento alcance su longitud crítica y se encuentre lista para la ciclización. En consecuencia, se estudió la interacción con las enzimas, de los polipirroles naturales P y D formados por pellet y Deaminasa de Euglena gracilis, sin liberarlos de sus enzimas.

De acuerdo a lo esperado, la incubación del intermediario P unido a la enzima con pellet o con Deaminasa y PBG, no sólo no inhibió la síntesis de porfirinas, sino que por el contrario, la incrementó. La incubación del intermediario D con la Deaminasa y PBG también aumentó la formación de Uroporfirinógeno I, aunque a las concentraciones más altas empleadas, el intermediario D inhibió su propia síntesis. Por otro lado, el intermediario D, inhibió significativamente la formación de porfirinas a partir de pellet, aún a bajas concentraciones.

De un estudio de las características de la reacción de Ehrlich con los intermediarios, de su estabilidad en diferentes condiciones, de su espectro visible, del análisis de los resultados obtenidos de la síntesis no enzimática de porfirinógenos a partir de los intermediarios P y D, a diferentes temperaturas y con distintas concentraciones del pirrol, del orden cinético de esa reacción y de la influencia del pH sobre la misma; se obtuvieron evidencias como para proponer que el D-intermediario era un tetrapirrilmetano no isomerizado, en tanto que el P-intermediario era un tetrapirrilmetano isomerizado.

En consecuencia, de los resultados obtenidos, estudiando la interacción de los intermediarios libres y unidos a la enzima, con las enzimas involucradas en la polimerización del PBG, y estudiando la síntesis química de uroporfirinógenos a partir de estos intermediarios, se ha propuesto: I) que la estructura del polipirrol formado por el pellet es la correspondiente a un tetrapirrilmetano del tipo PAAPAPAP y la del polipirrol formado por la Deaminasa corresponde a un tetrepirrilmetano no isomerizado del tipoPAPAPAPA, II) que los intermediarios deben estar unidos a la enzima a lo largo de la reacción,puesto que cuando se agregan

unidos a la enzima, es decir en su estado natural de asociación, a la PBGasa o a la Deaminasa, éstos se comportan como intermediarios normales, incrementando la formación total de porfirinas, III) que la reacción de conversión del PBG en uroporfirinógenos, ya sea por acción de la PBGasa o de la Deaminasa, ocurre en dos etapas, la primera da las cuales, involucraría una rápida formación de los intermediarios tetrapirrólicos sobre la superficie enzimática, y la segunda correspondería a la ciclización final de estos intermediarios, los cuales, además, en ciertos casos, se acumularían normalmente durante el curso de la reacción. Asimismo, la primera etapa tendría una velocidad relativamente mucho mayor que la correspondiente a la ciclización final y liberación del Uroporfirinógeno, que sería entonces la etapa de velocidad limitante; si bien en la mayoría de los tejidos, esta diferencia no se apreciaría en condiciones normales.

IV. Evidencias acerca de la existencia de un factor regulador que controla la síntesis enzimática de porfirinógenos en Euglena

Se habían tenido varias indicaciones acerca de la presencia, principalmente en homogenatos y sobrenadantes, de un factor que modificaba la actividad enzimática. Por estacionamiento, de sus soluciones, ocurría una activación espontánea a lo largo del tiempo, que llegaba a un máximo de 8 veces a los 22 días para Sobrenadante y de 7,5 veces a los 14 días para Homogenato.

Se llevaron a cabo estudios con el objeto de detectar, aislar e identificar ese factor regulador, que se encontró presente en los sobrenadantes de calentamiento de las fracciones H y S (S Ø y H Ø), así como en los eluídos correspondientes al volumen de cama, resultantes del pasaje por columnas de Sephadex G-25 de las fracciones H y S, que fueron designados factor H (FH) y factor S (FS); las respectivas proteínas, así obtenidas (PrH y PrS) a su vez presentaban un grado de activación de más de 10 veces.

Se encontró que tanto H Ø, como S Ø, FH y FS, eran capaces de activar varias veces a las preparaciones de H y S, y también, FH y FS solamente, aunque en menor grado (dos veces) a PrH y PrS, pero no modificaban la actividad de la PBGasa de pellet (P).

Se observó que habría algunas diferencias entre el factor presente en H y S Ø y aquel que se encontraba en FH y FS, que no era consecuencia del calentamie

Se estudió la termoestabilidad de FH y FS, resultando inalterados por el calentamiento, tampoco los afectó el estacionamiento a 4 °C, pero fueron destruídos por tratamiento ácido ó alcalino.

El efecto activante de los factores FH y FS, sobre H, S, PrH y PrS, fue comparable y del mismo orden que el producido por el ácido fólico a una concentración de 10^{-7} M y el Glutation reducido a 10^{-3} M; sin embargo ni los factores ni estos reactivos actuaron sobre la PBGasa de pellet, ya estuviera unida al mismo o liberada de la membrana por un agente caotrópico. El Pb a varias concentraciones, no tuvo efecto alguno sobre ninguna de las diferentes preparaciones de PBGasa.

En base a los resultados obtenidos, se propone un mecanismo para explicar la liberación y acción del factor regulador de la actividad de PBGasa en Euglena gracilis.

V. Mecanismo de acción de la conversión enzimática de PBG en Uroporfirinógenos

Teniendo en cuenta todas las evidencias experimentales obtenidas hasta el presente y el aporte surgido de estos estudio, se propone un mecanismo de acción para la PBGasa y la Deaminasa, que se ajusta cuali y cuantitativamente con toda la información disponible.

Una de las principales características, es que se considera que la etapa inicial, previa al proceso en sí, implica una asociación mol a mol subunidad a subunidad, de una unidad de Deaminasa con otra de Isomerasa, y que en el caso de complejo, la isomerización ocurre al comienzo mismo de la reacción, dando lugar a un dipirrilmetano reordenado PAAP; en cambio la Deaminasa, por una natural condensación cabeza-cola, forma un dipirrol PAPA. Al final de la polimerización, listos para su ciclización, se encuentran, provenientes de la PBGasa, un tetrapirrilmetano lineal isomerizado del tipo PAAPAPAP (o PAPAPAAP) que da lugar al Uroporfirinógeno III y por la vía de la Deaminasa, un tetrapirrilmetano no-isomerizado del tipo PAPAPAPA que lleva al Uroporfirinógeno I.

Se considera que el modelo presentado, además de constituir un esquema más actualizado, es más elástico en muchos aspectos, y es de por sí, una atrayente hipótesis de trabajo, que abre camino hacia nuevas vías de investigación.

REFERENCIAS

1. AARONSON, S. y BENSKY, B. (1962) J. Gen. Microbiol. 27, 75.

2. ARONSON, A.I. (1961) b) Biochim. Biophys. Acta 49, 98.

3. ARONSON, A.I. (1961) a) Biochim. Biophys. Acta 49, 89.

4. AARONSON, S. y SCHER, S. (1960) J.Protozool. 7, 156.

5. AARONSON J., MEYER, W.L. y BROCK, T.D. (1964) Nature 202 555.

6. ABRAHAM,A. y BACHHAWAT, B.K. (1962) BIOCHIM, Biophys Acta. 62, 376.

7. ABRAHAM, A. y BACHHAWAT, B.K. (1964). Indian J.Biochem. 1, 192.

8. ABRAHAM, A. y BACHHAWAT, B.K. (1965). Indian. J. Biochem. 1, 192.

9. ADAMS, J.F. y Mc EVAN, F. (1971) J. Clin. Pathol. 24 (1), 15.

10. AGHION, J. (1966). Phisiol. Vegetale. 4 (1), 67.

11. ALBAUM,H.G.; SCHATZ,A.; HUTNER, S.H. y HIRSCHFELD,A. (1950). Arch. Biochem. 29, 210.

12. AL-HAZIMI,H.M.G.; JACKSON,A.H. y RYDER,D.J.(1976) J.Chem.Soc. Chem.Comm., 188.

13. AMMON, R. y FRIEDRICH, G. (1967) Acta Biol.Med.Ger.19 (5), 669.

14. ANDERSON, L. (1967). Abstr. N.E.Rgional Plant.Physiol. Soc. Meetings, Boston.

15. ANDERSON, L.A. y SMILLIE, R.M. (1966) Biochim Biophys. Res. Commun. 23, 535.

16. ANDREWS P. (1964) Biochem J., 91, 222.

17. ANDREWS, P. (1965) Biochem J., 96, 595.

18. APP, A.A. y JAGENDORFF, A.T. (1963) J.Protozool. 10, 340.

19. APP. A.A. y JAGENDORFF, A.T. (1963). Biochem. Biophys. Acta 85, 427.

20. ARNON, A. (1949) Plant.Physiol., 24, 1.

21. ARNON, D.I. (1952). Science 116, 635.

22. ARNON, A., Metodhs in Enzymology, edts, H. Tabor y C.Tabor, N.Y., London, Acad. Press, 1, 25.

23. ASTRUP, E.G. (1978) Clin.Sci. Mol. Med. 54, 251.

24. BAKER, C.L. (1933) Arch. Protistenk. 80, 434.

25. BAKER, H.S.; HUTNER, S.H. y SOBOTKA, H. (1955). Ann.N.Y. Acad. Sci. 62, 351.

26. BAMJI, M.S. y KRINSKY, N.I. (1965) J.Bi l. Chem. 240, 467.

27. BARKER,H.A. (1936). J.Cellular Comp. Physiol. 8, 231.

28. BARNETT, E.W. PENNINGTON, C.J. (Jr.) y FAIRFIELD, S.A. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. 63 (4), 1261.

29. BASSHAM, J.A. y CALVIN, M. (1957) In "The Path of Carbon in Photosynthesis" Prenitice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

30. BATLLE, A.M. del C., (1967) J.Chromatog. 28,82.

31. BATLLE, A.M. del C., (1968) Ciencia e Investigación, 24, 242.

32. BATLLE, A.M. del C. 1973. Int. J. Biochem. 4 436.

33. BATLLE, A.M. del C., BENSON A., y RIMINGTON C. (1965), Biochem, J. 97, 731.

34. BATLLE, A.M. del C. and GRIENSTEIN, M. 1962. Biochem. Biophys. Acta 82. 13.

35. BATLLE, A.M. del C. y GRINSTEIN, M. (1962) Lat. Am. Meet. Cehm. B.A. Abstr., p.107.

36. BATLLE, A.M. del C. y GRINSTEIN, M. (1964) Biochem. Biophys. Acta, 82, 1.

37. BATLLE, A.M. del C.; LLAMBIAS, E.B.C., WIDER de XIFRA, E.A. y TIGIER, H.A. (1975). Int. J.Biochem. 31, 591.

38. BATLLE, A.M. del C.; LLAMBIAS,E.B.C.; WIDER DE XIFRA,E.A. and TIGIER, H.A. (1979). Int. J.Biochem. 386 - 591.

39. BATLLE A.M. del C. y RIMINGTON C. (1965) Ciencia e Investigación 22, 369.

40. BATLLE, A.M. del C. and ROSSETTI, M.V. (1977). Int. J.Biochem. 8 251.

41. BATLLE. A.M. del C. y STELLA, A.M. (1978). Int. J. Biochem. 9'

42. BATLLE, A.M. del C.; STELLA, A.M.; FERRAMOLA, A.M.; SOPENA, Y.; WIDER de XIFRA, E.A. and SANCOVICH, H.A. (1978) Int. J. Biochem 9 en prensa.

43. BATLLE, A.M. del C. WIDER de XIFRA, E.A. STELLA, A.M. and WITH, T.K. (1978) a TETRAPYRROL. Disc. Gro. Meet. Abstracts. p. 1.

44. BATLLE, A.M. del C., WIDER de XIFRA, E.A. STELLA, A.M.; BUSTOS, N. and WITH, T.K. (1978 b) Clin. Sci. Mol. Med. en prensa.

45. BATLLE, A.M. del C.; WIDER de XIFRA, E.A.; STELLA, A.M.; VAZQUEZ E.; BUSTOS, N. y MAGNIN, P.H. (1978). Rev. Nac. Dermatol.; en prensa.

46. BATLLE, A.M. del C., WIDER de XIFRA, E.A. and STELLA, A.M. (1978 d) Int. J. BIOCHEM 9.

47. BATRA, P.P. y TOLLIN, E. (1964). Biochem. Biophys. Acta 79, 371.

48. BATTERSBY, A.R. y Mc. DONALD, E. (1976). Phil. Trans.Roy. Soc. (B). 273, 161.

49. BATTERSBY, A.R.; Mc.DONALD, E.; WILLIAMS, D.C. y WRZIGER, H.K.W (1977a). J.Chem.Soc.Chem.Comm., 113.

50. BATTERSBY, A.R.; BUCKLEY, D.G.; McDONALD,E. y WILLIAMS,D.C. (1977b). J.Chem.Soc.Chem.Comm., 115

51. BATTERSBY,A.R.; JPHNSON, D.W.; Mc.DONALD,E. y WILLIAMS,D.C. (1977c). J.Chem. Soc.Chem.Comm., 117.

52. BAUMANN, E.: (1886) Uber Disulfone. Ber. deut. chem. Ges 19 2806.

53. BAUMSTARK,F.: (1874) Pflugers Arch. f. d. ges. Physiol. 9 568.

54. BEALE, S.I. (1971). Plant.Physiol. 48, 316.

55. BEAMS,H.W. y ANDERSON,E. (1961). Ann.Rev.Microbiol. 15, 47.

56. BEATTIE, D.S.; BASFORD, R.E. y KORITZ, S.B. (1966) Biochemistry, 5, 926.

57. BEAWAIS, P.; KLEIN, M.L., DENAVE, L. et MARTEL, C. (1976) Arch. Franc. Péd. 33, 987.

58. BELSKY, M.M. y SCHULTZ, J. (1962) J.PROTOZOOL. 9, 195.

59. BEN-EZZER, J.; RIMINGTON,C.; SHANI, M.; SELIGSOHN,U.; SHEBA,C. y SZEINBERG,A. (1971). Clin.Sci. 40,17.

60. BEN-HAYYIM,G. y SCHEJTER,A. (1973). Eur.J.Biochem. 46, 569.

61. BENNUN,A. y BLUM, J.J. (1966). Biochem. Biophys.Acta 120, 106.

62. BEN - SHAUL, Y. (1970) Can. J. Biol. 48, (5) 929.

63. BEN-SHAUL,Y.; EPSTEIN, H.T. y SCHIFF, J.A. (1965) Can. J.Bot. 43, 129.

64. BEN-SHAUL, y MARKUS, Y (1969) J.Cell Sci. 4, 627.

65. BEN-SHAUL, Y.; SCHIFF, J.A. y EPSTEIN,H.T. (1964). Plant.Physiol. 39,231

66. BEN-SHAUL, Y.; SILMAN, R. y ORPHIN, I. (1972) Physiol Veg.10, 255.

67. BENSON,A.A.; COOK. J.R. y YAGI,T. (1962). Plant.Physiol. 37, suppl., 44.

68. BENSON, R.E. (1972). Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 139 (4) 1096.

69. BERNETT, L.L.; WARD, V.L. y BROCKMAN, R.W. (1965) Biochem. Biophys. Acta 103, 478.

70. BERTINI, F.; BRANDES, D. y BUETOW, D.E. (1965). Biochem. Biophys, Acta 107, 171.

71. BERZELIUS, J.J. (1840) LEHRBUCH DER CHEMIE, 9 67, DRESDEN & LEIPZIG.

72. BIRGHAM, S. y SCHIFF, J.A. (1976) in "Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria, Eds. BÜcher,Th. et al., Elsevier-Amsterdam., p.73.

73. BLOCH, K. and RITTENBERG, D. (1949) J.Biol. Chem. 159, 45.

74. BLUM, J.J. (1965) J.Cell Biol. 24, 223.

75. BLUM, J.J. (1966) J. Gen. Physiol. 6, 1125.

76. BLUM, J.J. y BUETOW, D.E. (1963) Exptl. Cell. Res. 29, 407.

77. BLUM, J.S.; SOMMER, J.R. y KAHN,V. (1965) J.Protozool. 12,202.

78. BOGORAD, L. (1955). Plant. Physiol. 30, XLV.

79. BOGORAD, L. (1958a). J.Biol.Chem. 233, 501.

80. BOGORAD,L. (1958b). J.Biol.Chem. 233, 510.

81. BOGORAD, L. (1960). In "Comparative Biochemistry of Photoreactiv Systems." (Ed. by Allen, M.B.) P.227. Academic. Press. N.Y.

82. BOGORAD, L. (1962) In "Methods in Enzimology". Vol. 5, p.885. Academic.Press. N.Y.

83. BOGORAD, L. (1962) In "Physiology and Biochemistry of Algae" (R.A.Lewin, ed.); p. 385. Academic Press.N.Y.

84. BOGORAD, L. (1963). Ann.N.Y. Acad.Sci. 104, 676.

85. BOGORAD, L. (1966). In "The Chorophyll" (ed. por Vernon, L.P. y Seely,G.R.) pp.481. Academic.Press. N.Y.

86. BOLTON, E.T.; BRITTEN, R.J.; BYERS,T.J.; COWIE, D.B.; HOYER,B.; Mc CARTHY, B.J.; Mc QUILLEN,K. y ROBERTS,R.B. (1963). Carnegie Inst.Wash. Y.book. 1962-1963, 324.

87. BONKOWSKY, H.L.; TSCHUDY,D.P.; WEINBACH,E. y EBERT,P.S. (1973) Clin.Res. 21, 961.

88. BOUTIN, M.E. y KLEIN, R.M. (1972) Plant.Physiol. 49, 656.

89. BOVARNICK, J.G.; SCHIFF,J.A.; FREEDMAN,Z. y EGAN, J.M. (Jr). (1974) J.Gen. Microbiol. 83, 63.

90. BOVARNICK, J.G.; SUNG-WEN CHANG; SCHIFF, J.A. y SCHWARTZBACH, S.D. (1974). J.Gen. Microbiol. 83, 51.

91. BOWNE,S.W. (1964) Nature, 204, 801.

92. BRAGG,P.D. y POLGLASSE, W.J. (1963). J.Bacteriol. 85, 590.

93. BRANDES, D.; BUETOW, D.E.; BERTINI, F. y MALKOFF, D.B. (1964) Exptl. Mol. Pathol. 3. 583.

94. BRAWERMAN, G. (1962) Biochim. biophys. Acta, 61, 313.

95. BRAWERMAN, G. (1963) Biochim. Biophys. Acta 72, 317.

96. BRAWERMAN, G. (1968) In "The Biology of Euglena" (ed.D.Buetow) Vol. 2, pp. 127.

97. BRAWERMAN, G. y CHARGAFF, E. (1958) Biochem Biophys. Acta 31, 178.

98. BRAWERMAN, G. y CHARGAFF, E. (1960) Biochem. Biophys. Acta 37, 221.

99. BRAWERMAN, G.A.O. y CHARGAFF,E. (1962). Biochem Biophys.Acta 55, 326.

100. BRAWERMAN, G. y EISENSTADT, J.M. (1964) BIOCHIM, Biophys. Acta 91, 477.

101. BRAWERMAN, G. y EISENSTADT, J.M. (1964) J.Mol. Biol. 10, 403.

102. BRAWERMAN, G.; POGO, A.O. y CHARGAFF, E. (1960) Biochim. Biophys. Acta 48, 418.

103. BRAWERMAN, G.; POGO, A.O. y CHARGAFF, E. (1962) Biochem Biophys Acta 55, 32[illegible].

104. BRAWCRMAN, G. and KONIGSBERG, N. (1960). Biochim. Biophys. Acta 43, 374.

105. BREE; M. Hêleme y LEFORT-TRAM,M. (1974). Comp.Rend.Acad.Sci. París, 248, Serie D, 1349.

106. BRODIE, M.J.; GRAHAM,D.J.y THOMPSON,G.G. (1976) Clin.Sci.Mol. Med. 50, 431.

107. BRODY, M. (1968) In "The Biology of Euglena". Ed. Buetow D.E. Acad. Press, Inc., N.Y. Vol. 2, p.277.

108. BRODY, M.; BRODY,S. y LEVINE, J.H. (1965). J.Protozool. 12, 465.

109. BRODY, S. y BRODY,M. (1961). Nature. 189, 547.

110. BRODY, S. and BRODY, M. (1963) In "Photosynthetic Mechanism of Green Plants", p.445.

111. BRODY, S.; BRODY, M. y LEVINE, J.H. (1965) Biochim. Biophys. Acta 94, 310.

112. BROWN, J.S. (1959) Carnegie Inst. Wosh. Yr. book 59, 330.

113. BROWN, J.S. (1963) Biochim. Biophys, Acta 75, 299.

114. BROWN, J.S. and FRENCH, C.S. (1961) Biophys J. 1, 538.

115. BROWN, R.O. y HASELKAM R. (1971), Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 68 (10), 2.536.

116. BUETOW, D.E. (1962). Exptl. Cell Res. 27, 137.

117. BUETOW, D.E. (1963). Nature 199, 196.

118. BUETOW, D.E. (1965) J.Cellular Comp. Physiol. 66,235.

119. BUETOW, D.E. (1966), J.Protozool. 13, 585.

120. BUETOW, D.E. (1967). Nature 213, 1127.

121. BUETOW, D.E. y BUCHANAN, P.J. (1964). Exptl. Cell Res. 36, 204.

122. BUETOW, D.E. y BUCHANAN, P.J. (1965) Biochem, Biophys. Acta 96, 9.

123. BUETOW, D.E. y MEGO, J.L. (1967). BIOCHEM. Biophys. Acta 134, 167.

124. BUETOW, D.E. y PADILLA, G.M. (1963). J.Protozool. 10, 121.

125. BUETOW, D.E. y SCHUIT, K.E. (1968) J.Protozool. 15 (4), 770.

126. BULLOCK, E.; JOHNSON, A.W.: MAKMAN, E. y SCHAW, K.B. (1958). J!Chem. Soc. Chem. Comm., 1430.

127. BURNHAM, B.F. y LASCELLES, J. (1963) Biochem J. 87, 462.

128. BUTLER, W.L. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 93, 413.

129. BUTTLER, W.K. y BRIGES, W.R. (1966) Biochim, Biophys. Acta. 112,45.

130. BYRNE, J. y MARSLAND, D. (1965) J.Cell.Comp.Physiol. 65, 277.

131. CALVAYRAC, R.et LEDOIGT,G. (1976). Plant. Sci. Letters 7 (4), 249.

132. CAM, C. (1959) Intoksikasyona bagli deri porfirin loci, Dirim (Instambul) 34 11.

133. CAM,C. and NIGOGOSYAN,G. (1957) J.A.M.A. 183. 88.

134. CARELL, E.F. (1969) J.Cell Biol. 141, 1969.

135. CARELL, E.F. y KAHN, J.S. (1964). Arch. Biochem.Biophys. 108, 1.

136. CARELL, E.F. y PRICE,C.A. (1965). Plant.Physiol. 40 (1), 1.

137. CARPENTER,A.T. y SCOTT,J. (1959). Biochem. J. 71, 325.

138. CARPENTER,A.T. y SCOTT,J. (1961). Biochem.Biophys.Acta 52, 195.

139. CARTER, H.E.; OHNO,K.; NOJIMA, S.; TIPTON, C.L. y STANACEV,N.Z. (1961) J.Lipid Res. 2, 215.

140. CELMER, W.D. y EBRINGER, L. (1967) J.Protozool. 14, 263.

141. COHEN, D. y SCHIFF, J.A. (1973). Biophys. J. 13, 111 a.

142. COHEN,C.E. y SCHIFF,J.A. (1976). Photochemistry y Photobiology. 24, 555.

143. CONFORD, P. (1964). Biochem. J. 91. 64.

144. CONFORD, P. y BENSON, A. (1963) J. Chromat., 10, 141.

145. COOK.J.R.(1960). Ph.D.Thesis. Univ. of California. Los Angeles, California.

146. COOK. J.R. (1963). J. Protozool. 10, 436.

147. COOK, J.R. (1965). Plant. Cell Physiol. (Tokyo). 6, 301.

148. COOK, J.R. (1966a). Plant. Physiol. 41, 821.

149. COOK, J.R. (1966b). Biol.Bull. 131, 83.

150. COOK, J.R. (1966c). J. Cell Biol. 29, 369.

151. COOK, J.R. (1966d). In "Cell Sinchrony-Studies in Biosynthetic Regulation". (Camerom, I.L. and Padilla, G.M.,eds.) p.153- Academic Press-N.Y.

152. COOK, J.R. (1972) Biophys. J. 12, 1467.

152a.COOK,J.R. y CARVER,M. (1966) Plant.Cell Physiol (Tokyo). 7,377.

153. COOK,J.R.; HARRIS, P. y NACHTWEY, D.S. (1974) Plant Physiol. 53, 284.

154. COOK, J.R. y HEINRICH, B. (1965) J.Protozool. 12, 581.

155. COOK,J.R. y HESS,M. (1964), Biochim.Biophys. Acta 80, 148.

156. COOKSON,C. and RIMINGTON,C. (1953) Nature 171 875.

157. COOKSON, G. y RIMINGTON C. (1954) Biochem J., 57, 476.

158. COX, E.; WHITE, J.R. y FLASKS,J.G. (1964) Proc. Natl. Acad.Sci. U.S. 51, 703.

159. CRAMER, M. y MYERS, J. (1952). Arch.Mikrobiol. 17, 384.

160. CRIDDLE, R.S. y PARK, L. (1964). Biochim. Biophys. Commun. 17, 7

161. CHANCELLOR-MADISON, J.; NOLE,C.R. (1963) Science 142, 61.

162. CHANG, I.C. y KAHN, J.S. (1966) Arch Biochem. Biophys. 117, 282.

163. CHEMIAE,G.M. (1962) Plant. Physiol. 37 suppl., 1.

164. CHEMIAE,G.M. (1963). Biochim.Biophys. Acta 70, 504.

165. CHEMIAE,G.M. (1964) Arch. Biochim.Biophys. 105, 163.

166 CHEMIAE,G.M. y KERR, P.C. (1965) Plant.Physiol. 40, 452.

167. CHISOLM, J.J.Disturbances in the biosynthesis of heme in lead intoxication J.Pediatrics 64 (1964) 159=169.

168. DALTON, J. y DOHERTY,R.C. (1969) Nature (London) 223. 1151.

169. DANFORTH,W. (1953). Arch. Biochem Biophys. 46, 164.

170. DANFORTH, W.F. (1961) J.Protozool. 8, 152.

171. DANFORTH,W.F. (1968) In"The Biology of Euglena"Vol. II. Ed. por Buetow. Academic Press. N.Y.

172. DANFORTH,W.F. y KAPLAN,J.H. (1964). J.Ptotozool. 11 (suppl.), 26.

173. DANFORTH,W.F. y WILSON, B.W. (1961) J. Gen. Microbiol. 24, 95.

174. DAUNER, H.O.; GUNZER, G.; HEGER, I. y MULLER, G. (1976), Z. physiol. Chem. 357, 147.

175. DAVENPORT, H.E. y HILL,R. (1952). Proc.Roy. Soc. B. 139, 327.

176. DAVIES, J.; GILBERT, W. y GORINI, L. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51, 883.

177. DAVIES, W.H.; MERCER, E.I. y GOODWIN,T.W. (1965). Phytochemistry 4, 741.

178. DAVIES, W.H.; MERCER,E.I. y GOODWIN,T.W. (1966). Biochem J. 98, 369.

179. DAVIES, R.C. y NEUBERGER,A. (1973). Biochem J. 133, 471.

180. DAVIS P. (1964). Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404.

181. DEAN, G. y BARNES, H.D. 1954. Brit.Med. J.II. 89.

182. DE DEKEN-GRENSON, M. (1959) Exptl. Cell, Res. 18, 185.

183. DE DEKER - GRENSON, M. y GODTS, A. (1960) Exptl. Cell. REs. 19, 376.

184. DE DEKEN, M. y MESSIN, S. (1958) Biochem Biophys. Acta 27, 145.

185. DIAMOND, J. (1976) Planta (Berlin) 130, (2) 145.

186. DIXON, M. (1953) Biochem J. 55, 457.

187. DOBRSCHANSKY, D. (1906) citado por Mc. Ewin: Porphyria in Austraia - A Review of the literature and Australian experience (1973) Med. Services - Rep. Department, Canberra, Australia.

188. DOSS, M. (1973) Editor "Regulation of Porphyrin and Heme Biosynthesis" Part I Special issue Enzyme 16 1-

189. DOSS, M.Editor "Regulation of Porphyrin and Heme Biosynthesis" Part II Special issue Enzyme 17 (1974) 1-

190. DOSS, M. (1976) Editor "Porphyrins in Human Doseases" S.Karger Basel Publishers. 1-

191. DOWDLE, E.B.; MUSTARD, P. y EALES, L. (1967) S.Afr.Med.J. 41, 1093.

192. DRABKIN, D.L. Thudichum - Chemist of the Brain. Univ.Of Pennsylvania Press, Philadelphia (1958).

193. DRESEL, E.I.B. and FALK, J.E. Nature 172 (1953) 1185.

194. DROBNICA, L. y EBRINGER, L. (1963) Folia. Miorabiol (Prague) 8 , 56.

195. DROWN (1969) Arch. Mikrobiol. 68 (4) 377.

196. DUBASH, P.J. y REGE, D.W. (1967). Biochim.Biophys. Acta. 136, 185.

197. DUBASH, P.J. y REGE, D.V. (1970). J.Protozool. 17, (2), 349.

198. DUYSEN, L.N. y AMESZ, J. (1962) Biochim. Biophys. Acta. 64, 243.

199. EBBON, J.G. y TAIT,G.H.(1969) Biochem J. 111, 573.

200. EBRINGER,L. (1962a) J. Protozool. 9, 373.

201. EBRINGER, L. (1962) b. Naturwissenschaften 49, 334.

202. EBRINGER,L. (1962 c) J. Antibiotics (Tokyo) Ser. A. 15, 113.

203. EBRINGER, L. (1972) J.General Microbiol. 71, 35.

204. EBRINGER, L. y FOLTINOVA (1972) Acta Fac.Rerum. Nat. Univ. Comeniance Microbiol. 2, 43.

205. EBRINGER, L. y KUPKOVA, H. (1967) Folia Microbiol. 12, 36.

206. EBRINGER, L.; MEGO, J.L. y JURASEK, A. (1969) Archiv. FÜr Mikrobiologie 64, 229.

207. EBRINGER, L.; MEGO, J.L.; JURASEK, A. y KADA, R. (1969) J. Gen. Microbiol. 59, 203.

208. EBRINGER, L.; MEGO, J.L. y PODOVA, G. (1967) Biochem. Biophys. Res, Commun. 29, 571.

209. EDELMAN, M.; COWAN Ch. A.; EPSTEIN, H.T. y SCHIFF, J.A. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. 52. 1215.

210. EDELMAN, M.; SCHIFF, J.A. y EPSTEIN, H.T. (1965) J. Mol. Biol. 1 769,

211. EDELMAN, M.; SCHIFF, J.A. y EPSTEIN, H.T. (1965) J. Mol. Biol. 17, 463.

212. EHREMBERG, C.G. (1830). Physik. Abhamdl. Kgl. Akad. Wiss., Berlín, pp. 1.

213. EISENSTADT, J. y BRAWERMAN, G. (1963). Biochim. Biophys. Acta. 76, 319.

214. EISENSTADT, J. y BRAWERMAN, G. (1964a) Biochim. Biophys. Acta. 80. 463.

215. EISENSTADT, J. y BRAWERMAN, G. (1964). J.Mol.Biol. 10, 392.

216. EPSTEIN,S.A. (1960). Nature 188, 143.

217. EPSTEIN, H.T. y ALLAWAY, E. (1967) Biochim. Biophys. Acta 142, 195.

218. EPSTEIN, H.T. y SCHIFF, J.A. (1961) J.Protzool. 8, 427.

219. EPSTEIN, S.S. y TIMMIS,G.M. (1963) J.Protozool. 10, 63.

220. EPSTEIN, S.S.; WEISS, J.B.; CAUSEY,D. y BUSH, P. (1962) J.Protozool. 9, 336.

221. ERIKSEN, L.; HOFSTAD, E. y SEIP, M. (1973) Acta Ped. Scand. 62, 385.

222. ERWIN, J. y BLOCK, K. (1962) Biochem. Biophys, Res. Commun. 9, 103.

223. ERWIN, J.A. y BLOCK, K. (1963) Biochem.J. 338, 496.

224. ERWIN, J.A. y BLOCK, K. (1964) Science 143, 1006.

225. ESHLEMAN, J.N. y DANFORTH, W.F. (1964) J.Protozool. 11, 394.

226. EVANS,W.R. y SAN PIETRO,A. (1966). Arch.Biochem. Biophys. 113, 236.

227. EVANS, W.R. y SMILLIE, R.M. (1962) Plant Physiol. Suppl. 37, XXXVIII.

228. EVANS, W.R.; SMILLIE, R.M. y ROBERT, A. (1971) J. Exp. Bot. 22, (71) 371.

229. EVERSOLE, R.A. y WOLKEN, J.J. (1958) Science 127. 287.

230. EYSTER, C.; BROWN, T.E.; TANNER, H.A. y HOOD, S.L. (1958). Plant. Physiol. 33, 235.

231. FALK, J.E. "Porphyrins and Metalloporphyrins" BBA Library Vol 2, Elsevier Publ. Co Amsterdam, London, New York (1964).

232. FALK, J.E. y BENSON, A. (1958) Biochem J., 55, 101.

233. FALK, J.E. DRESEL, E.I.B. and RIMINGTON, C. 1953. Nature 172 292.

234. FALK, J.E. y DRESEL, E.I. B. (1960) Biochim, Biophys. Acta, 39, 458.

235. FASULO, M.P., VANNINI, G.L. DALL'OLIO; BRUNI, A. (1973). Ann. Univ. Ferrara Ser 4. Bot., 4, 95.

236. FASULO, M.P., VANNINI, G.L. DALL'OLIO (1976) Giorn. Bot. Ital. 110 (3) 179.

237. FASULO, M.P., VANNINI, G.L. BRUNI, A. and MARES D. (1977a) Z.Pflanzenphysiol. Bd. 80S. 407.

238. FASULO, M.P., VANNINI, G.L. y DALL'Olio (1977d) Ann. Meeting of Cytology Soc. Bot. It. Abstracts p.1.

239. FASULO, M.P., VANNINI, G.L. y DALL'OLIO (1978) Caryologia in press.

240. FELLIG, J. (1960) Science 131,832.

241. FELLIG, J. y WILLEY, C.E. (1960). Science 132, 1835.

242. FISCHER, H. y ORTH, H.: Die Chemie des Pyrrols I. (1934); II,1 (1937); II,2 (1940) Akadem. Verlagsgeseli-schaft, Leipzig. Photostatic Editions. Ann Arbor Univ. Press 1946 and Johnson Reprint Corp., New York 1968.

243. FLYGER, V. (1977). Amer.J.Pathol. 87 (1), 269.

244. FOGG,G.E. (1953). "The Metabolism of Algae", Methuen, London.

245. FOYE,W.O.; LANG, W.E.; SEINTOSKY, J.V.; CHAMBERLAIN, R.E. y GUINARI, J.R. (1954) J.Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 44, 261.

246. FRANCK, B.; FELS, G.; UFER, G. y ROWOLD, A. (1977a). ANGEW Chem. Int. Ed. Engl. 16(9), 651.

247. FRANCK, B.; FELS, G. y UFER, G. (1977b). Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 16 (9), 652.

248. FRANCK B. & ROWOLD A. (1975). Angen. Chem. Int. Ed. 14, 423.

249. FRANCK B., ROWOLD A., WEGNER CH. & ECKERT H.G. (1976) Phil. Trans. R.Soc.Lond.B. 273, 181.

250. FRANCK B & WEGNER C. (1975). Angen. Chem. Int. Ed. 14, 424.

251. FRENCH, C.S. (1966) In "Biochemistry of Chloroplasts" (T.W. Goodwin, ed.) Vol.I, p.377. Acad. Press. N.Y.

252. FRENCH, J.: NICHOLSON,D. and RIMINGTON, C. (1970) Biochem, J. 120 393.

253. FREYSSNET, G. (1976). Plant. Physiol. 57, 824.

254. FREYSSNET, G. (1976) Plant.Physiol. 57, 831.

255. FRYDMAN R.B. & FEINSTEIN G. (1974). Biochim. biophys. Acta 350, 358.

256. FRYDMAN, R.B. & FRYDMAN B. (1970) Archs Biochim. Biophys. 136, 193-202.

257. FRYDMAN R.B. & FRYDMAN B. (1973) BBActa 293, 506.

258. FRYDMAN, R.B. & FRYDMAN B. (1975) FEBS lett 52, 317.

259. FRYDMAN, B. y FRYDMAN, R.B. (1975 b) Acc. Chem. REs. 8, 201.

260. FRYDMAN,R.B.; LEVY,E.S.; VALASINAS,A. y FRYDMAN,B. (1978a). Biochemistry. 17 (1) 110.

261. FRYDMAN, R.B.; LEVY,E.S.; VALASINAS,A. y FRYDMAN,B. (1978b). Biochemistry 17 (1), 115.

262. FRYDMAN B., REIL S. VALASINAS A. FRYDMAN R.B. & RAPOPORT H. (1971). J.Am.chem. Soc. 93, 2738.

263. FRYDMAN R.B., TOMARO M.L., WANSCHELBAUM A. & FRYDMAN B. (1972a) FEBS Lett. 26, 203-206.

264. FRYDMAN R.B. VALASINAS A., LEVY S. & FRYDMAN B. (1974b) FEBS lett. 38, 134.

265. FRYDMAN R.B., VALASINAS A., RAPOPORT H. & FRYDMAN B. (1972b). FEBS Lett. 25, 309.

266. FUHOP, J.H. and SMITH, K.M. "Laboratory Methods in Porphyrins and Metalloporphyrin Research" Elsevier Co. Amsterdam, 1975.

267. FULLER, R.C. y GIBBS, M. (1959). Plant. Physiol. 34, 324.

268. FUNK, H.B. y NATHAN, H.A. (1958). Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.99, 394.

269. GALJDOS,A. & GAJDOS-TOROK,M. (1969) Porphyrines et Porphyries, Biochimie et Clinique Masson & Co. Ed.

270. GAMES, G., JACKSON, A.H. and JACKSON, J. (1976) J.Chem.Soc. Chem.Comm., 187.

271. GARROD, A.E. (1900). Lancet ii,I. 73, 142, 214.

272. GIBBS, M. (1952). Nature 170, 164.

273. GIBBS,S.P. (1960). J.Ultraestruc.Res. 4, 127.

274. GIBOR,A. y GRANICK, S. 9 (1962b) J.Cell.Biol. 15, 599.

275. GIBOR, A. y GRANICK, S. (1962a) J.Protozool. 9, (3) 327.

276. GIBSON, K.O.; NEUBERGER,A. y TAIT,G.H. (1963). Biochem J. 88, 325.

277. GILBERTSEN A. S., LOWRY P.T. HAWKENSN V. & WATSON C.I. (1959) J.Clin.Invest. 38, 1166-1170.

278. GOJDICS, M. (1934) Trans Am. Microscop. Soc. 53, 299.

279. GOJDICS, M. (1953). "The Genus Euglena" Univ. of Wilcosin, Madison, Wilcosin.

280. GOLDBERG,I.H. (1965) Am.J.Med.39, 722.

281. GOLDEMBERG,S.M. y MARECHAL L.R. (1963) Biochim. Biophys. Acta 71. 743.

282. GOLDEMBERG,S.H.; MARECHAL,L.R. y DE SOUZA,B.C. (1966) J.Biol. Chem. 241, 45.

283. GOODMAN,N.S. y SCHIFF,J.A. (1964) J.Protozool. 11, 120.

284. GRANDCHAMP B., GRELIER M. & NORDMANN Y. (1975) La Nouv. Presse Med. 4, 1801.

285. GRANDCHAMP, B.; PHUNG,N.; GRELIER, M. and NORDMANN,Y. (1976) Clin Chim. Acta 70, 113

286. GRANICK, S. y KAPPAS,A. (1967) J.Biol. Chem. 242 4587.

287. GRANICK, S. y MAUZERALL, (1958). Fed. Proc. 17, 233.

288. GRANICK,S. y MAUZERALL, (1961). In "Metabolic Pathways" (2da. ed. p.525; ed. por Greenberg, D.M. Academic. Press.

289. GRANICK,S. y URATA,G. (1963) J.Biol.Chem. 238, 821.

290. GRAY, R.A. y HENDLIN, D. (1962) Plant Physiol. 37, 223.

291. GRENDLER,P.L.; DUHAM,H.A. y RAPOPORT,H. (1978). Clin.Chem. 24 (2), 230.

292. GRENSON,M. (1964) Intern. Rev.Cytol. 16, 37.

293. GRIFFITHS,D.J. (1965). Sci. Progr. (London) 53, 553.

294. GROS,E.C.R. (1844) Acad.Sci. París, 19, 1118.

295. GROSS, J.A. (1965) Science (Wash.) 147, 741.

296. GROSS, J.A. y JAHN, T.L. (1962) J.Protozool. 2, 71.

297. GROSS, J.A.; JAHN, T.L. y BERNSTEIN, E. (1955) J.Protozool. 2, 71.

298. GROSS, J.A. y WOLKEN, J.J. (1960) Science 132, 357.

299. GUNTHER, H.: (1911) Deut. Med. Wschr. 37 1771.

300. GUTTMAN, H.N. y TENDLER, M.D. (1966) Fed. Proc. 25, 562.

301. GUTTMAN, H.N. y TENDLER, M.D. (1966) Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 121, 1140.

302. HAIGH,W.G. y BEEVERS, H. (1964). Arch. Biochem. Biophys. 107, 147.

303. HALL,R.P. (1933). "Protozoology". Prentice-Hall. Englewood Cliffs. New Jersey.

304. HANKINS,C.N. y MILLS,S.E. (1976). J.Biol. Chem. 251,7774.

305. HANKINS,C.N. y MILLS, S.E. (1977) J.Biol.Chem. 252, 235.

306. HARRIS,E.H., PRESTON, J.F. y EISENSTADT,J.M. (1973) Biochemistry 12 (6) 1227.

307. HARRIS, R.V.; WOOD, B.J. y JAMES, A.T. (1965) Biochem J. 94, 22.

308. HEILMEYER L. & CLOTTEN R. (1969) Klin Wchernschr. 47,71.

309. HEILMEYER L., CLOTTEN R., KERP L., MERKER H., PORRA A. & WETZEL H.P. (1963). Disch. Med. Wschr. 88, 2449-456.

310. HEINRICH,B. (1966). M.S.Thesis, Univ. of Maine, Orono, Maine.

311. HEINRICH, B. y COOK, J.R. (1966) J.Protozool. 14 (4), 548.

312. HEINRICH, S.H. y COOK, J.R. (1967) J.Protozool. 14, (4), 548.

313. HIGUCHI, M. y BOGORAD, L. (1975). Ann. N.Y. Acad. Sci. 244, 401

314. HILL, R. (1954) Nature. 174. 501.

315. HILL, R. y BENDALL, F. (1960) Nature 186, 136.

316. HILL, H.; EPSTEIN, H.T. y SCHIFF, J.A. (1966b) Biophys. J. 6, 135.

317. HILL,H.; SCHIFF, J.A. y EPSTEIN,H.T. (1966a) Biophys. J. 6, 125.

318. HOARE B.S. & HEATH H. (1959) Biochem J. 73, 679.

319. HOARE D.S. & HEATH H. (1960) Biochim, biophys. Acta 39, 167.69.

320. HOFSTAD F. SEIP. M. & ERIKSEN L. (1973) Acta Ped. Scand. 26,380.

321. HOLOWINSKY, A.W. y SCHIFF, J.A. (1970) Plant.Physiol. 45, 339.

322. HOLTON, R.W.; BLECKER, H.H. y OMOR (1964) Phytochemistry 3, 395.

323. HOPPE-SEYLER,F.: Das Hämatin. TÜbinger Med.-Chem.Untersuchungen, Heft. (1871) 4 523.

324. HOPPE-Seyler, F.: Uber das Chlrophyll der Pflanzen Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem 4 (1879) 193.

325. HOVENKAMP-OBBEMA,R. (1975). ZÜr Pflanzenphysiol.Bd. 75,1.

326. HOVENKAMP-OBBEMA,R.; MOORMAN,A. y STEGWEE,D. (1974). ZÜr Pflanzenphysiol.Bd. 72, 277.

327. HOVENKAMP-OBBEMA,R. y STEGWEE,D. (1974). ZÜr Pflanzenphysiol. Bd. 73, 430.

328. HUBER-PESTALOZZI,G. (1955). In "Die Dinnengerwaser".

329. HULANICKA,O.; ERWIN,J. y BLOCK,K. (1964) J.Biol.Chem.239, 2778.

331. HURWITZ, J.; FURTH, J.J.; MALAMY,M. y ALEXANDER,M. (1962) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.) 48, 1222.

332. HUTH,W. (1967) Flora Allg. Bol. Ztg. Abt. Physiol. Biochem. 158 (1), 58.

333. HUTNER,S.H.; NATHAN,H.A.; AARONSON,S.; BACKER,H. y SCHER,S. (195 Ann.N.Y.Aca d.Sci.76, 457.

334. HUTNER,S.H. y PROVASOLI, L. (1951) In "Biochemistry and Physiology of Protozoa". (S.H.Hutner and A.Lwoff, eds.), 1, 27. Academic Press, New York.

335. HUTNER,S.H. y PROVASOLI,L. (1955). In "Biochemistry and Physiology of Protozoa". (Hutner, S.H. and Lwoff, A., eds.) Vol. II, pp. 11-47. Academic Press N.Y.

336. HUTNER,S.H.; PROVASOLI, L. y STOKSTAD,E.L.R. (1949). Proc.Soc. Exptl. Biol. Med. 70, 118.

337. HUZISIGE,H. y SATOH,K. (1960). Biol. J.Okayama Univ. 6, 71.

338. IKEGAMI,I.; KATOH,S. y TAKAMIYA,A. (1970). Plan.Cell Physiol.11, 777.

339. IRYNE, D.G. y WETTERBERG, L. (1972). Lancet 1, 1201.

R 7/3

340. IWANOV, E.D.; ADJAROV, D. und TSANEV, R. (1977) Acta biol. med.germ., 36, 801.

341. JACKSON, A.H. Seminars in Hematology Vol 14 193 (19700.

342. JACKSON, A.H.; NAGARAJA RAO, K.R., SUPPHAYEN, D.M. and SMITH, S.G. Intermediates between Uroporphyrinogen I and Coproporphyrinogen I J.C.Soc. Chem.Comm. (1977) 696-698.

343. JACKSON,A.H.; SANCOVICH,H.A.; FERRAMOLA,A.M.; EVANS,N.; GAMES,D.E. MATLIN,S.A., ELDER,G.H. and SMITH,S.G. Macrocycles intermediates in the biosynthesis of porphyrins, Phil. Trans. R. Soc. London, B. 273 (1976) 191-206.

344. JACOBSON, S.J.; RAPOPORT,H. y ELLMAN,G.L. (1975). Biol. Phychiatry 10,= 91.

345. JAHN,T.L. (1946). Quart. Rev.Biol. 21, 246.

346. JAHN,T.L. (1951). In "Manual of Pharmacology" (Smith,G.M., ed.), p 69-81. Chronica Botanica, Waltham, Massachusetts.

347. JIROVEC, O. (1949) Experimentia 5, 74.

348. JORDAN P.M. & SHEMIN D. (1973) J. biol. Chem. 248, 1019.

349. KAHN, J.S. (1966) Biochim. Biophys. Res. Commun. 24, 329.

350. KAHN, J.S. (1973). Arch.Biochem.Biophys. 159,646.

351. KAHN, J.S. (1974). Arch.Biochem.Biophys. 164, 266.

352. KAMITAKAHARA,R.; PEARLSTONE,J.: POULSON,R. and POGLASE,W. (1973) Can. J. Microb. 19 1239-1242.

353. KARALI, E.F. y PRICE, C.A. (1963). Nature 198, 708.

354. KAST,A. (1888) Uber die Art der Darreichung und Verordnung des Sulfonals. Therapeut. Monatshefte 11 316.

355. KATOH,S. y SAN PIETRO, A. (1967). Arch.Biochem.Biophys. 118,488.

356. KATOH,S. y TAKAMIYA,A. (1965) J.Biochem (Tokyo) 58, 396.

357. KEILIN, D. y HARTREE, E.F. (1938) Proc.Roy. Soc. B. 124, 397.

358. KEILIN, D. Y HARTREE, E.F. (1951) Biochem J., 49, 88.

359. KEILIN, D. y HARTREE, E.F., Methods in Enzymology, ed. H.Tabor y C. Tabor. N.Y. and London, Acad. Press, 2, 214.

360. KEMPNER, E.S. y MILLER, J.M. (1965) Biochemistry 4 2735.

361. KEMPNER, E.S. y MILLER, J.H. 1965a) Biochim. Biophys. Acta, 104, 11.

362. KEMPNER,E.S. y MILLER, J.H. (1965b) Biochem. Biophys. Acta 104,18

363. KEMPNER, E.S. y MILLER, J.H. (1965a). Biochemistry 4, 2735.

364. KENNEDY,G.; JACKSON,A.H.; KENNER,C. and SUCKLING,S. (1970) FEBS Letters 6 9-

365. KIRK, J.T.O. (1966) In "Biochemistry of Chloroplasts" (T.W. Goodwin, ed.) Vol. 1, p.319. Acad. Press.

366. KIRK, J.T.O. (1962 a) Biochim. Biophys. Acta 56,139.

367. KIRK, J.T.O. (1962 b) Biochim. Biophys. Acta 59, 476.

368. KIRK, J.T.O. (1968). Planta 78,200.

369. KIRK, J.T.O. (1970). Nature. (London). 226,182.

370. KIRK, J.T.O. y ALLEN, R.L. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 523.

371. KIRK, J.T.O. y JUNIPER,B. (1964). J.Roy,Microscop. Soc. 82, 205.

372. KISLEV, N. y EISENSTADT,J.M. (1972). Europ. J.Biochem. 31, 226.

373. KIVIC, P.A. y VESK, M. (1974) Can. J. Vot. 52, 695.

374. KLEIN, S.; SCHIFF, J.A. y HOLOWINSKY, A.W. (1972), Dev. Biol. 28, 253.

375. KNEZCK, B.D. y MAIER, R.H. (1971). Commun.Soil. Sci. Plant.Anal. 2 (1), 37.

376. KOEHL C., ABECASIS J. & WERTENSCHAG J. (1975). La Nouv. Press. Méd. 4, 2735.

377. KOK, B. y HOCK, G. (1961) In "A Symposium on Light and Life" (W.D. Mc Elroy and Gloss, eds.) p. 397. Johns. Hopfins Press, Baltimore, Maryland.

378. KONDO,T.; KUCHIBA,K.; OHTSUKA,Y.; YANAQISOWA,W.; SHIOMURA,T. y TAMINATO, T. (1974). Jap. J. Human.Genet. 18 (4), 378.

379. KONDO,T.; KUCHIBA,K. y SHIMIZU,Y. (1976a). 10 Int.Congress.Gastr. Budapest.Abst.p. 481.

380. KONDO,T.: KUCHIBA,K. y SHIMIZU,Y. (1976b) Gastroenterology 70 (6), 1117.

381. KONDO,T.; YAGI,R. y KCHIBA,K. (1975).New.Engl. J.Med. 292 (19), 9.

382. KOSKELO, P. & TENHUNEN, R. (1976) Editors "International Conference on Porphyrin Metabolism Biochemical and Clinical aspects Ann Clin Res. Vol 8, Suppl 17. 1-

383. KOSKELO, P.; TOIVONEN, L. y ADLERCREUTS, H. (1967) Clin.Chem. 13, 1006.

384. KREIMER,BIRNBAWN M. (1977) Anal.Asoc.Quim.Arg.

385. KRINSKY,N.I. (1964) Biochim Biophys. Acta 88, 487.

386. KRINSKY,N.I. (1964). Plant.Physiol. 39, 441.

387. KRINSKY, N.I. (1966) In "Biochemistry of Chloroplasts" (Goodwin,T.W. ed) Vol.I p.423. Academic Press N.Y.

388. KRINSKY, N.I., GORDON, A. y STERN, A.I. (1964). Plant. Physiol. 39, 441.

389. KRINSKY, N.I. y GOLDSMITH, T. (1960) Arch.Biochem.Biophys. 91, 271.

390. KUSHNER, J.P., BARBUTO, A.J. and LEE, G.R. (1976) J.Clin.Invest. 58 1089.

391. LABBE, P.; VOLLAND, C. and CHAIX, P. (1967) Biochim. Biophys. Acta 143.70

392. LARA, J.C. y MILLS, S.E. (1972) J. Bacteriol. 110, 1100.

393. LASCELLES, J. (1956). Biochem. J. 62, 78.

394. LASCELLES, J. "Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation" W.A. Benjamín, Inc. (1964) New York - Amsterdam.

395. LAZZARINI, R.A. y SAN PIETRO, A. (1963). In "Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria", p.453. Japan. Soc. Plant. Physiologists-Univ. o Tokyo Press, Tokyo.

396. LEEDALE, G.F.; MEEUSE, B.J. y PRINGSHEIM, E.G. (1965).Arch. Mikrobiol. 50, 68.

397. LEFF, J.; MANDEL, M.; EPSTEIN, H.T. y SCHIFF, J.A. (1963) Biochem. Biophys. Res. Commun. 13, 126.

398. LEFORT, M. (1964) Compt. Rend. 258, 4318.

399. LEMBERG, R. y LEGGE, R.: Hematin compounds and bile pigments Interscience, New York (1949)

400. LEVEDAHL, B.H. y WILSON, B.W. (1966). Expte. Cell Res.39(1) 242.

401. LEVIN, E.Y. (1968) a Science 161 907.

402. LEVIN E. (1968b) Biochemistry 7, 3781-3.

403. LEVIN E. Y & COLEMAN D.L., (1967) J.Biol.Chem. 242, 4248-4.

404. LEVIN, E.Y. & FLYGER, V. (1971) Science 174, 59.

405. LEVITZKI A.& KOSHLAND D.E. Jr.(1969) FEBS Symposium 19,263.

406. LEWIS, S.C.; SCHIFF, J.A. y EPSTEIM, H.T. (1961). Biochim. Biophys. Res. Commun. 5, 221.

407. LEWIS, S.C.; SCHIFF, J.A. y EPTSTEIN, H.T. (1965). J. Protozool. 12, 281.

408. LIANG TONG, N.C.H.; GROSS, J.A. y JAHN, T.L. (1965) J. Protozool, 12, 153.

409. LIE, J.T.; UNGAR, B. y COWLING, D.C. (1969). J. Clin.Pathol. 22, 153.

410. LINNANE, A.W. y STEWART, P.R. (1967). Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 511.

411. LISS, R.; SCHUFF, J.A. y EPSTEIN, H.T. (1965) Unpublished.

412. LITWAK, G. y PRAMER, D. (1957) Arch.Biochem.Biophys. 68, 396.

413. LOCKWOOD W. & BENSON A. (1960) Biochem. J. 75, 372.

414. LOCKWOOD W.H.& RIMINGTON C. (1957) Biochem. J. 67,8.

415. LOCKWOOD, W. and RIMINGTON, C. (195,). Biochem J.75, 372.

416. LOEFER, J.P. (1951). Physiol. Zool. 24, 155.

417. LORD, J.M.; ARMITAGE, T.L. y MERRET, M.J. (1975). Plant. Physiol. 56, 600.

418. LOWFF, A. ed. (1951). In "Physiology and Biochemistry of Protozoa", vol. I, p.1-26. Academic Press-N.Y.

419., LWOFF, A. y DUSI, H. (1935) Compt. Rend. Soc. Biol. 119, 1092.

420. LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR L. y RANDALL R. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.

421. LOWRY, O. ROSEBROUGH N., FARR L. y RANDALL R., Methods in Enzymology, ed.

422. H. TABOR y C. TABOR, N.Y., London, Acad. Press, 3, 4497.

423. LYMAN, H.; EPSTEIN, H.T. y SCHIFF, J.A. (1959) J.Protozool. 6, 264.

424. LYMAN, H.; EPSTEIN, H.T. y SCHIFF, J.A. (1961) Biochim. Biophys. Acta (Amst) 50, 301.

425. LYNCH, V.H. y CALVIN, M. (1953). 56, 890. Ann.N.Y.Acad.Sci.

426. LLAMBIAS, E.B.C., (1971) Tesis Doctoral, pág. 158.

427. LLAMBIAS E.B.C. & BATLLE A.M. del C. (1970a) FEBS lett 6, 285.

428. LLAMBIAS E.B.C.& BATLLE A.M.del C. (1970b) FEBS lett.9,180.

429. LLAMBIAS E.B.C. & BATLLE A.M. del C.(1970c) Biochim.Biophys. Acta 220, 552.

430. LLAMBIAS E.B. & BATLLE A.M. del C. (1971a) Biochem.J.121, 327.

431. LLAMBIAS E.B.C. & BATLLE A.M. del C.(1971b) Biohim.Biophys. Acta 227,180.

432. LLAMBIAS, E.B.A. LOCASCIO,G. and BATLLE,A.M. del C.(1971) Anal. As. Q. Arg. 59 271.

433. MAGNUS, I.A., JARRET, A.; PRANKERD, T.A. y RIMINGTON, C.: (1961) Erythropoietic protoporphyria. A new porphyria syndrome with solar urticaria due to protoporphyrinaemia The Lancet II 448.

434. MAGNUSSEN C.R., LEVINE, J.B., DOHERTY J.M., CHEESMAN J.O. & TSCHUDY D.P. (1974) 44,857. Blood

435. MALKOFF, D.B. y BUETOW, D.E. (1964).Exptl.Cell.Res.35,58.

436. MANDEVILLE, S.E.; CRESPI, H.L. y KATZ, J.J. (1964).Science 46, 769.

437. MARECHAL, L.R. y GOLDEMBERG,S.H.(1964) J.Biol.Chem.239,3163.

438. MARKS, G.S. (1969) "Heme and Chlorophyll - Chemical, Biochemical and Medical Aspects. D.van Nostrans Co.Ltd,London.

439. MARZULLO, G. (1965) Ph. D. Thesis, Illinois Inst.Technol., Chicago, Illinois.

440. MARZULLO, G. y DANFORTH, W.F. (1964). J.Gen.Microbiol.34,21

441. MASUYA T. (1969) Acta haematol.Japan. 32, 465.

442. MATHEWSON, J.H. y CORWIN, A.H. (1961). J.Am.Chem.Soc.83,135.

443. Mc. CALLAZ D.R. (1962) Science 137, 225.

444. Mc. CALLAZ D.R. (1963).J.Protozool. 10, 491.

445. Mc. CALLA, D.R. (1965a) J. Protozool. 12, 34.

446. Mc. CALLAZ D.R. (1965b) Science 148, 498.

447. Mc CALLA, D.R. (1965c) Can. J. Microbiol.11, 185.

448. Mc. CALLA,D.R. (1966) J. Protozool. 13, 472.

449. Mc CALLA, D.R. y ALLAN, R.K. (1964) Nature 201, 504.

450. MEEUSE, B.J.D. (1964) . Basteria 28, 67.

451. MEGO, J.L. (1964a) Biochem. Biophys. Acta 79, 221.

452. MEGO, J.L. (1968). I "The Biology of Euglena" Vol. 2, p.362. Ed. by D. Buetow. Acad. Press, N.Y.

453. MEGO, J.L. y BUETOW, D.E. (1965) In "Le Chloroplaste; Crissance et Vieillissement" (ed. C.Sironual) p.274.Masson, París.

454. MEGO, J.L. y BUETOW, D.E. (1966) J.Protozool. 13, 20.

455. MEGO, J.L. y BUETOW, D.E. (1967) In "Le Chloroplaste, Crossance et Vieillissement" Ed. by C. Sironual, p.274. París; Mason et Cie.

456. MENON, L.A. y SHEMIN, D. (1967). Arch. Biochem.Biophys. 121, 304.

457. MEYER U.A. (1973) Enzyme 16,334.

458. MEYER U.S.& SCHMID R. (1973). Fedn. Am. Socs. esp.Biol. 32, 1649.

459. MEYER U.A. STRAND L.S.DOSS H., REES H. & MARVER H.S.(1972) New Engl. J. Med. 286, 1277.

460. MICHAELIS, A. y GIBOR, A. (1973) J. Cell.Sci.13, 799.

461. MICHAJLOW, W. (1965). Acta Parasitolo. Polon. 13, 313.

462. MILLAR, E. y PRICE, C.A. (1960). Plant.Physiol.35,Suppl., xxiii.

463. MILLER, M.J. y RAPOPORT, H.(1977).J.Am.Chem.Soc.9(10),3479.

464. MIYAGIK CARDINAL R. BOSSENMAIER J.& WATSON C.J. (1971). Lab. clin. Med. 78, 683.

465. MIYAGIK CARDINAL, R.; PETRYKA,Z.J.; BOSSENMAIER,J. y WATSON, C.J. (1976). Amer. J. Hemat. 21 (1:3), 3

466. MOORE, D. y LABBE R. (1964) Clin. Chem., 10, 1105.

467. MOORE, R.B. (1970). Bull. Envirom.Contam.Toxicol.5, (3),226.

468. MORIBEN, L.G.; HERSCHENOV, B., AARONSON, S. y BENSKY,B.(1963) J. Protozool. 10, 80.

469. MORIMURA, Y., y TAMIYA, H. (1964) J. Indian Botan.Soc. 42A, 22.

470. MUDD. S.; YOSHIDE, A. y KOIKE, M. (1958). J.Bacteriol. 75,224.

471. MULDER, G.H. (1844): Uber eisenfreises Hamatin. J.f.prakt. Chem. 32 , 186.

472. MUTHU KRISHMAN, S.; PADMANABAN, G. y SARMA, P.S. (1968). Biochim. Biophys. Res. Commun. 31, 333.

473. MUTO, T. (1957). J. Vitaminol. (Tokyo). 3, 50.

474. NAGAI, J. y BLOCH, K. (1965). J.Biol.Chem. 240, 3702.

475. NAGAI, J. y BLOCH, K. (1966). J. Biol. Chem. 241, 1925.

476. NAKANO, Y.; OKAMOTO, K.; TODA, S. y FUWA, K. (1978).Agric. Biol. Chem. 42 (5), 901.

477. NAKAO K., WADA O. KITAMURA T., UONO K. & URATA G. (1966). Nature New Biol. 210, 838.

478. NANDI, D. and SHEMIN, D. (1968). J. Biol. Chem. 243, 1236.

479. NATHAN, H.A. y FUNK, H.B. (1962). Proc. Soc. Exptl.Biol.Med. 109, 213.

480. NEAL, W.K.; FUNKHOUSER, E.A. y PRICE,C.A. (1968). J. Protozool. 15 (4), 671.

481. NEFF, R.H. (1960) J. Protozool. 7, 69.

482. NEUBERGER, A. and SCOTT, J.J. (1953) Nature 172, 1093.

483. NICOLAS, P. INNOCENT, J.P. y NIGOU, V. (1977) Molec.Gen. Genet. 155, 123.

484. NISHIMURA, J.S. and GRINNEL, F.In "Advances in Enzymology (Ed Meister) vol. 36, 183. Wiley & Sons - Chicester.

485. NISHIMURA, M. y HUZISIGE, (1959). J. Biochem.46, 225.

486. NORDMAN, Y. and GRANDCHAMP, B. (1976) Biochem.Med. 15, 119.

487. NORRIS, L.; NORRIS, R.E. y CALVIN, M. (1955).J.Exptl. Botany 6, 64.

488. O'DONNELL, E.H.J. (1965). Cytologia, (Tokyo). 30, 118.

489. O'DONNELL-ALVEDA,E. (1967). Cytologie 32 (3/4), 568.

490. OHASHI, A. and KIKUGHI, G. (1977) Arch. Biochem.Biophys. 178, 607.

491. OHASHI, A. and SINOHARA, H. (1978). Biochim. Biophys. Res. Comm. 80 370.

492. OHMANN, E. (1963). Naturwissenschaften 50, 552.

493. OHMANN, E. (1964), Biochim Biophys. Acta 82, 325.

494. OLSON, J.M. y SMILLIE, R.M. (1963). In "Photosynthetic Mechanism of Green Plants". Publ. 1145, p.56. Natl.Acad. Sci. Natl. Res. Council, Washington, D.C.

495. OPHIR I. y BEN-SHAUL, Y. (1968) In "Proc. 4th Europ.reg. Conf. Electron Microsc." Vol. 2 (ed. D.S. Bocciarelli) p.p.419-420.Reuve:Tipografía Poliglota Vaticana.

496. ORNSTEIN L., (1964)Ann. N.Y. Acad. Sci.121, 321.

497. PAPPENHEIMER, y JOHNSON, (1937). Brit.J.Exp.Path.18, 239.

498. PERINI, F.; KAMEN, M.D. y SCHIFF, J.A. (1964a). Biochim. Biophys. Acta. 88, 74.

499. PERINI, E.; SCHIFF, J.A. y KAMEN, M.B. (1964b) Biochim. Biophys. Acta 88, 91.

500. PERL, M. (1972) Biochem. J. 130, 813.

501. PETERKOJSKY, A. y ROCKER, E. (1961) Plant Physiol.36, 409.

502. PETERSON, L.R.; HAMERNYIK, P.; BIRD,T.D. and LABBE,R.F. (1976) Clin. Che. 22 (11) 1835.

503. PETROPULOS, S.F. (1964). Science (Wash. D.C.) 145, 392.

504. PIPER, W.N. y TEPHLY, T.R. (1974). Life Science 14, 873.

505. PIPER, W.N. y van LIER, R.B.L. (1977). Mol. Pharmacol. 13, 1126.

506. PITELKA,D.R. (1963). "Electron Microscopic Structure of Protozoa". Pergamon, Oxford.

507. PLUSCEC J. & BOGORAD L. (1970).Biochemistry 9, 4736-3.

508. POGO, A.O. y ARCE, A. (1964). Exptl.Cell Res, 36, 390.

509. POGO, B. y POGO, O. (1964) J. Cell. Biol. 22, 296.

510. POGO,B. y POGO, O. (1965). J. Protozool. 12, 96.

511. POGO, A.O.; BRAWERHAN, G., and CHARGAFF, E. (1962). Biochemistry, 1, 128.

512. POLGLASE, W.L. (1963). Nature 206, 298.

513. POLLACK, S.E. y RUSSELL, C.S. (1978). FEBS Letters. 90, (1), 47.

514. POULSON, R. and POGLASE, W., (1973) Biochim. Biophys.Acta 329, 256.

515. POULSON, R. and POGLASE, W. J. Biol. Chem. 250 1269.

516. PRAMER, D. (1956) Arch, Biochem. Biophys. 62, 265.

517. PRICE, C.A. (1961). Biochem. J. 82, 61.

518. PRICE, C.A. (1962a) Science 135, 46.

519. PRICE, C.A. (1962). Biochem. J. 82, 61.

520. PRICE, C. y CARELL E.F. (1964) Plant Physiol., 39, 862.

521. PRICE, C.A. y MILLAR, E. (1962). Plant. Physiol.37, 423.

522. PRICE, C.A. y VALLE, B. (1962) Plant Physiol. 37, 428.

523. PRINGSHEIM, E.G. (1948) New Phytologist 47, 52.

524. PRINGSHEIM, E.G. (1956). Nova Acta Leopoldina. 18 (125),1.

525. PRINGSHEIM, E. (1958) Rev. Algolologique (N.S.) 4, 41.

526. PRINGSHEIM, E.G. y HOVASSE, R. (1948). New Phytologist. 47, 52.

527. PRINGSHEIM, E. y PRINGSHEIM, O. (1952) New Phytologist.51,65.

528. PROSK, J.A. y DONALD, J.P. (1971). Plant.Physiol. 48(2),150.

529. PROVASOLI, L.; HUTNER, S.H. y PINTER, J.J. (1951) Cold Springs Harbor Symp. Quant. Biol. 16, 113.

530. PROVASOLI, L.; HUTNER, S.H. y SCHATZ, A. (1948) Proc.Soc. Exptl. Biol. Med. 69, 279.

531. RADDIN, N.S.; RITTENBERG, D. and SHEMIN, D. (1950) J.Biol. Chem. 184, 745.

532. RADNER R. & BOGORAD L. (1972) Biochemistry 11, 904-910.

533. RAY, D.S. y HANAWALT, P.C. (1965) J.Mol.Biol. 9, 812.

534. REEVES, H.C., KADIS,S., y AJIL, S. (1962). Biochim.Biophys. Acta 57, 403.

535. REGER, B.J.; FAIRFIELD, S.A.; EPLER, J.L. y BARNETT,W.E. (1970). Proc. Nat. Acad.Sci.(USA).67, 1207.

536. REGER, J.F. y BEAMS, H.W. (1954). Proc.Iowa.Acad.Sci.61,593.

537. REINISCH, C.C. y FUNK, H.B. (1966) J. Protozool.13,(suppl),7.

538. RICHARD, F. y NIGON, V. (1972). Compt.Rend.Acad.Sci.,Serie D, 1307.

539. RICHARD, F. y NIGON, V. (1973). Biochim.Biophys.Acta 313, 130.

540. RIMINGTON, C. (Pink Tooth) (1936) Onderstepoort J. Vet.Sci. 7 567.

541. RIMINGTON, C.: (1939) Proc. Roy. Soc.B.127, 106.

542. RIMINGTON, C. (1957) An.Rev.Biochem.26 561.

543. RIMINGTON, C. (1958). Reviews of Pure and Applied Chemistry-Royal Australian Che. Unv. 8, 129.

544. RIMINGTON, C.: (1960). Biochem J. 75, 620.

545. RIMINGTON, C. (1966) Relazione al VI Congresso Internazionale di Patologia Clínica - Roma - 341.

546. RIMINGTON, C. and BENSON, A. (1961) J. Chromat. 6, 350.

547. RIMINGTON, C. and KROL, C. (1955). Nature 175, 629.

548. RIMINGTON, C. y SVEINSSON, S.L.: The spectrophotometric determination of uroporphyrin Scand.J.Clin.Lab.Invest.2 (1950). 209.

549. RIMINGTON, C. and TOOTH, B. (1961). J. Biochem. Tokyo, 49, 456.

550. RIMINGTON, C. & WITH T.K. (1971). Dan. med. Bull. 20, 5.

551. RIMINGTON C.& WITH T.K. (1973).Dan.Med.Bull.20,5.

552. ROBIN, R.; REEVES, H.C.; WEGENER, W.S.; MEGRAW,R.E. y AJIL, S.J. (1965). Science 150, 1548.

553. ROBINS, W.J.; HERVEY, A. y STEBBINS, M.E. (1953) Ann. N.Y. acad. Sci. 56, 818.

554. ROMEO G., GLENN B.L. & LEVIN E.Y. (1970) Biochem.Genet.4,719.

555. ROMEO, G. KABACK, M.M. and LEVIN,E.Y. (1970a) Biochem. Genet. 4, 659.

556. ROMEO, G. KABACK, M.M. and LEVIN, E.Y. (19706) Biochem.Genet. 4, 719.

557. ROMEO G. & LEVIN E.Y. (1969). Proc. mat. Acad.Sci.U.S.A. 63, 856.

558. ROSEN, W.G. y GAWLIK, S.R. (1961). J.Protozool.8, 90.

559. ROSENBERG, A. (1963) Biochemistry 2, 1148.

560. ROSENBERG, A. y PARKER, M. (1964) Biochestry 3, 254.

561. ROSETTI,M, V.; PARERA V.E. y BATLLE A.M. del C. (1976) Acta physiol.latinoam., 26 (5), 371-378.

562. ROZENKRANZ, H.S. y LEVY, J.A. (1965) Biochim.Biophys Acta 95, 181.

563. R TTER, W.J. (1964). Federation Proc. 23, 1248.

564. SACHS, P. Klin Wochschr 10 (1931), 1123.

565. SAGAN, L. (1965). J. Protozool. 12, 105.

566. SALTMAN, P. (1953). J. Biol. Chem. 200, 145.

567. SALVADOR, G.F. (1978). Comp. Rend.Acad.Sci.,Serie D,286,49.

568. SANCOVICH, H.A. BATLLE A.M. del C. & GRINSTEIN M. (1969a). Biochim. biophys. Acta 191, 130.

569. SANCOVICH, H.A. ; BATLLE, A.M. del C. and GRINSTEIN,M. (1969b) FEBS letters. 3, 223.

570. SANCOVICH, H.A., FERRAMOLA A.M., BATLLE, A.M. del C. y GRINSTEIN, M. (1970). Methods in Enzymology (Edited by Tabor H. and Tabor, C.W.) vol.17, pag. 220, Academic Press, New York.

571. SANCOVICH, H.A.; FERRAMOLA, A.M.; BATLLE, A.M. del C.; KIVI-LEVICH, A. y GRINSTEIN, M. Acta Physiológica Latino Americana, (1976). 26 (5), 379.

572. SANO, S. (1966) J.Biol. Chem.241, 5276.

573. SANO, S. y GRANICK, S. (1961). J. Biol. Chem.236, 1173.

574. SAN PIETRO, A. y BLOCK, C.C. (1965) Ann. Rev.Plant Physiol. 16, 155.

575. SAN PIETRO, A. y LANG, H.M. (1958). J.Biol.Chem. 231,211.

576. SASSA S. GRANICK S. BICKERS D.R. BRADLOW H. & KAPPAS A.(1974) Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A. 71,732.

577. SASSA S. GRANICK,S.,KAPPAS A. & LEVERE R. D. (1973).Fedn. Proc. 32, 565 (Abstract).

578. SASSA, S.; SOLISH, G.; LEVERE, R.D. and KAPPAS, A. (1975). J.Exp. Med. 142, 722.

579. SCHER, S. y COLLINGE, J.C. (1965). Nature 205, 828.

580. SCHIFF, J.A. (1963). Cargenie Inst. Wash. Y.B. 62, 375.

581. SCHIEF, J.A. (1971). Stadler Symposia (1971). 3, 89.

582. SCHIFF, J.A. (1973). In "Advan ces in Morphogenesis" Vol.10, pp. 265. Academic Press. N.Y. London.

583. SCHIFF, J.A. (1974). in "Proc. Thrird Int. Congress on Photosynthesis". Ed. M. Avron, Elsevier, Amsterdam, p. 1691.

584. SCHIFF, J.A. (1975). in "Les Cycles Cellulares et Leurs Blocage chez Plusieurs Protistes", C N R S, Gif-sur-Yvette, France. p.79

585. SC IFF, J.A. y EPSTEIN H.T. (1960) I. "The Biology of Euglena' Vol. 2, pp. 326.

586. SCHIFF, J.A. y EPSTEIN, M.T. (1965) In "Reproduction: Molecular, Subcellular and Cellular" p.131. Acad. Press Inc., N.Y. and London (ed. M.Locke).

587. SCHIFF, J.A. y EPSTEIN, H.T. (1968) In "The Biology of Euglena" Vol 2 (ed. D. Buetow) p.p.285-334.N.Y. and London: Acad. Press.

588. SCHIFF, J.A.; LYMAN, H. y EPSTEIN, H.T. (1961a) Biochem. Biophys. Acta 50, 310.

589. SCHIFF, J.A.; LYMAN, H. y EPSTEIN, H.T. (1961 b) Biochem Biophys. Acta 51, 340.

590. SCHIFF, J.A. y ZELDIN, M. (1968) J.Cell. Physiol.(Suppl.) 72, 103.

591. SCHRIFT, A. (1966). Plant. Physiol. 41, 405.

592. SCHULTZ, J.H. : Ein Fall von Pemphigus leprosus compliciert durch Lepra visceralis. Inauguraldissertation (Med.), Greifswald (1874).

593. SCHUMAKER, H.M., TISHLER, P.V.; and KNIGHTON,D.J. (1976) Clin. Chem. 22 (12) 1991.

594. SCHWARTZ, H.S.; GAROFALO, M.; STERNBERG, S.A. y PHILLIPS,F.S. (1965) Cancer Res. 25, 1867.

595. SCHWARTZ, J.M.; EISENSTADT, J.M.; BRAWERMAN, G. y ZINDER,N.D. (1965). Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.).53, 195.

596. SCHWARTZ, R.; SALAUN, J.P.; SCHARTZ, M.L. y DURANTON, H. (1972). Physiol. Veg. 10 (1), 133.

597. SCHWARTZ, S. JOHNSON, J.A. STEPHENSON, B.D. ANDERSON,A.S. EDMONSON, P.R. & FUSSARO, R.M.(1971) J.Lab.Clin.Med.78,411.

598. SCHWARTZBACH, S.D. y SCHIFF, J.A. (1971). Plant. Physiol. 47,: S-45.

599. SCHWARTZBACH, S.D.; GOLDSTEIN, N.H. y SCHIFF, J.A. (1974). Plant. Physiol. 53, S-4.

600. SCOTT, A.I.; HO, K.S.; KAJIWARA, T. y TAKAHASHI,T. (1976). J. Am. Chem. Soc. 98, (6), 1589.

601. SCOTT, N.S. y SMILLIE, R.M. (1967) Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, (4) 598.

602. SEARS W.G. & EALES L. (1974). Enzym e 17,11.

603. SELSKY, M.I. (1964). J.Protozool. 11 (sppl), 26.

604. SHAPIRO, D.M. (1961). Ph.Thesis, Johns Hopkims, Univ.Baltimore, Maryland.

605. SHEMIN, D. (1976). Phil. Trans. R. Soc.London, B. 273,109.

606. SHEMIN, D. and KUMIN,S. (1952). J.Biol. Chem. 1, 827.

607. SHEMIN, D. and RITTENBERG, D. (1945). J.Biol.Chem 159, 567.

608. SHEMIN, D. and RITTENBERG, D. (1951). J.Biol. Chem.192, 515.

609. SHERATA, T.E. y KEMPNER, E.S. (1978).J.Bacteriol.133,396.

610. SHIGEURA,H.T. y GORDON, C.N. (1962). J.Biol.Chem.237,1937.

611. SHIMIZU, Y.; KONDO, T.; KUCHIBA, K. y URATA, G. (1977). J. Lab. Clin.Med. 89, 517.

612. SHNEYOUR, A.J. (1969) Exp. Cell. Res. 58, (1) 1.

613. SIEDEL W. & MOLLER H. (1939). Hoppe Seyler's Z. physiol.Chem. 259.

614. SIEDEL W., POLNETZ W. von & EISENRICH F. (1947).Naturwissenschaften 34, 314.

615. SIEGEL, J.N. y GENTILE, A.C. (1966). Plant Physiol.41,670.

616. SIEGESMUND, K.A.; ROSEN, W.G. y GAWLIK, S.R. (1962).Am.J. Botany 49, 137.

617. SMILLIE, R.M. (1963) Can. J. Botany 41, 123.

618. SMILLIE, R.M. (1964). In "Fructosa 1,6-difosfatasa and its Role in Gluconeogenesis".

619. SMILLIE, R.M. (1968) "The Biology of Euglena", Vol.2,p.13. Acad. Press, N.Y. and London.

620. SMILLIE, R.M.; EVANS, W.R. y LYMAN, H. (1963). Brookhave-Symp. Biol. 16, 89.

621. SMILLIE, R. M.; GRAHAM, D.; DWYER, M.R.; GRIESE, A. y TOBIN, N.F. (1967) B.B. Research Commun. 28 (4), 604.

622. SMILLIE, R.M. y KROTKOV, G. (1960). Arch. Biochem. Biophys. 89, 83.

623. SMILLIE R.M.; GRAHAM y P.R. DWYER, M.R.; GRIEVE, A. y TOBIN, N.F. (1967), Biochim. Biophys. Res. Comm. 28,(4), 604.

624. SMITH, J.H.C. y FRENCH, C.S. (1963) Ann.Res. Plant Physiol. 14, 181.

625. SMITH, S.G.; JACKSON, A.H. and JACKSON, T.R. Ann. Clin.Res. vol.8 , suppl.17. (1976), 53-55.

626. SOLDO, A.T. (1955). Arch. Biochem. Biophys. 55, 71.

627. SOMMER, J.R. y BLUM, J.J. (1965b). J.Cell Biol. 24, 235.

628. SPOTTS, C.R. y STANIER, R.Y. (1961) Nature 192, 633.

629. STEVENS E. FRYDMAN R.B. & FRYDMAN B. (1968). Biochim.biophys. Acta 158, 196.

630. STELLA de ROSELLINI, A.M.C. (1977) Tesis de Doctorado en Química. U.B.A.

631. TELLA, A.M.; PARERA, V.E.; LLAMBIAS, E.B.C and BATLLE,A.M. del C.(1971). Biochim. Biophys. Acta 252, 481.

632. STERN, A.I. y AVRON M. (1966). Biochim,Biophys Acta 118,557.

633. STERN, A.I.; EPSTEIN, H.T.; SCHIFF, J.A. (1964b). Plant. Physiol. 39, 226.

634. STERN, E.A.; SCHIFF, J.A. y EPSTEIN, H.T. (1964a) Plant Physiol. 39, 220.

635. STERN, A.I.; SCHIFF, J.A. y KLEIN, H.P. (1960) J. Protozool. 7 , 52.

636. STEWART, A.; RAYMOND, P. y GREGOY, P. (1969). Microbios 1, 253.

637. STOKVIS, B.J. Over Twee Zeldzame Keurstoffen in urine van zieken (1889). Med. Tydschr Geneesk 2R 25 (2), 409.

638. STRAND, L.J.; FELSCHER,B.F.; REDECKER, A.G. and MARVER,H.S(197 Proc. Natl. Acad. Sci (U.S.A.) 67, 1315.

639. STRAND L.J. MEYER U.A.,FELSHER B. P., REDECKER A.G. & MARVER H.S. (1972) J. clin. Invest. 51, 2530.

640. SWEENEY V.P., PATHAK M.A. & ASBURY A.K. (1970) Brain 93,369.

641. TAIT, G. (1972) Biochem. J. 128, 1159.

642. TCHKHOTINE, S. (1936). Compt. Rend.Soc.Biol. 121, 1162.

643. TEPHLY, T.R. (1975). Pophyrins in Human Diseases - Report of the Discussions. p.128.

644. TERNETZ, C. (1912). J.B. Wiss. Bot. 51, 435.

645. THREFALL, D.R. y GOODWIN, T.W. (1964) Biochem J.90, 40.

646. TIGIER, H.A.; BATLLE, A.M. del C. and LOCASCIO,G.(1970). Enzymologia 38, 43.

647. TOCHER, R.D. (1962). M.Thesis, Univ.of Washington, Seattle, Washington.

648. TOCHER, R.D. (1962)b. Cited by Meeuse (1964).

649. TONG, N.C.H.L.; GROSS, J.A. y JAHN, T.L. (1965). J.Protozool. 12, 153.

650. TOWSLEY, P.M. y NEILANDS, J.B. (1957). J.Biol. Chem. 244,695.

651. TROWN, P.W. (1965). Biochemistry 4, 908.

652. TSCHUDY, D.P.; PERLORTH, M.G.; MARVER, H.S.; COLLINS,A. HUNTER, G. Jr. and RECHCIGL, M.Jr. (1965),Proc.Acad.Natl Sci (U.S.A.) 53, 841.

653. TYLER, D.D. y ESTABROOK, R.W. (1966). J.Biol.Chem.241,1672.

654. UEDA, K.(1958). Cytología (Tokyo). 23, 56.

655. UMEZAWA, H. (1964), In "Recent Advances in Chemistry and Biochemistry of Antibiotics". Microbiol.Chem. Res.Found., Tokyo, pp.40.

656. VAVRA, J. (1956) Arch. Mikrobiol. 25, 223.

657. VAVRA, J. (1956). Quoted by Pringsheim (1956).

658. VAVRA, J. (1957) Folia Biol. 3, 108.

659. VAISHERG, A.J.; SCHIFF, J.A.; LI, L. y FREEDMAN, (1976). Plant. Physiol. 57, 594.

660. VALASINAS, A.; FRYDMAN, R.B.; DIAZ, L. y FRYDMAN, B. (1978). XIV Reunión Nacional de la SAIB-Abstracts D-26.

661. VAN DEENEN, L.L. y HAVENKATE, F. (1966) In "Biochemistry of the Chloroplasts" (T.W. Goodwin, Ed.) Vol I, p.117, Acad. Press, N.Y.

662. VANNINI, G.L. FASULO, M.P. e BRUNI, A. (1976) Giorn. Bot. Ital. 110 (a) 1976.

663. VENKATARAMAM, S.; NETRAWALI, M.S. y STREENIVASAM, A.(1965). Biochem. J. 96, 552.

664. VOELLER, B.R. (1964). In "The Cell" (Brachet, J. y Mirsky, A.E., eds.); Vol. VI. p.81. Academic Press, New York.

665. VOGEL, K. y BARKER, A.A. (1968). J. Protozool. 15 (4),657.

666. VON WETTSTEIN, D. (1961). Can. y Botany 39, 1537.

667. WACKER, W.E.C. (1962). Biochemistry 1, 859.

668. WALLDENSTROM, J. y VAHLQUIST, B.C.:(1939). Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 260, 189.

669. WARBURG O. y CHRISTIAN W. (1941) Biochem. J., 310, 384.

670. WARBURG, O. y CHRISTIAN W., Methods in Enzymology,ed.H.TAbor y C. Tabor, N.Y. London, Acad. Press, 3, 451.

671. WATSON, C. RUNGE, W. RADDEIMI, L.DOSSENMAIER, I. & CARDINALE, R.(1964). Proc. Natl. Acad.Sci. (USA) 52, 478.

672. WATSON, C. and SCHWARTZ, S.(1941). Proc. Soc. Exptl.Biol. Med. 47, 393.

673. WEBER K., OSBORN M. (1969) J. Biol.Chem, 244, 4406.

674. WENRICH, D.H. (1924). Biol. Bull. 47, 149.

675. WIDER de XIFRA and BATLLE, A.M. del C. (1973) Enzyme 16,128.

676. WIDER de XIFRA,A.E. and BATLLE, A.M. del C. (1974).Int.J. Biochem. 5, 129.

677. WIDER de XIFRA, A.E. and BATLLE, A.M. del C. (1976). In "Porphyrin in Human Diseases" 25 Ed.Doss,M.Karger, Basel.

678. WODER de XIFRA,E.A. BATLLE,A.M. del C.and TIGIER,H.A.(1971) Biochim. Biochim. Biophys. Acta235 - 511.

679. WIDER de XIFRA, E.A.; SANDY, J.D.; DAVIES, R.and NEUBERGER, A. (1976) Phil Trans R. Soc. Lond. B. 273, 79.

680. WIDER de XIFRA, E.A.; STELLA, A.M. and BATLLE, A.M.del C. (1978). Plant Sciences Letters, en prensa.

681. WIDER de XIFRA,E.A. and TIGIER, H.A. (1971) Enzymology 41, 217-231.

682. WILDNER, G.H. y HAUSKA, G. (1974)(a). Arch,Biochem,Biophys. 167, 127.

683. WILDNER, G.F. y HAUSKA, G. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 164, 127.

684. WILLSTATTER, R. and MIEG (1913), Ann Che. 400, 147 citado en WILLSTATER, R. en "Investigations in Chkrophyll" Science Press Lancaster Pa, (1928).

685. WILSON, B.W., y DANFORTH, W.F. (1958) J.Gen. Microbiol. 18, 535.

686. WILSSNER, W. (1968) Planta, 79 (1), 92.

687. WITH, T. (1975), Danish Medical Bulletion, 22, 77.

688. WOLFOVITCH, R. y PERL, M. (1972) Biochem J. 130, 819.

689. WOLKEN, J.J. (1956). J. Protozool. 3, 211.

690. WOLKEN, J.J. (1958). Ann. N.Y.Acad. Sci. 74, 164.

691. WOLKEN, J. J. (1961). "EUGLENA, an Experimental Organism for Biochemical and Biophysical Studies" - Inst. Microbiol. Rutgers, The State University, New Brunswick, New Jersey.

692. WOLKEN, J.J. (1963) In "Photosynthetic Mechanism of Green Plants", p.515. Publ. 1145. Natl. Acad.Sci.-Natl.Res.Council Washington, D.C.

693. WOLKEN, J.J. y GROSS, J.A. (1963) J. Protzool. 10, 189.

694. WOLKEN, J.J. y MELLON, A.D. (1956). J.Gen.Physiol.39, 675.

695. WOLKEN, J.J.; MELLON, A.D. y GREENBLATT, C.L. (1955). J. Protozool. 2, 89.

696. WOLKEN, J.J. y PALADE, O.G.E. (1953). Ann. N.Y. Acad.Sci. 56, 873.

697. WOLKOFF, A.W.; COHEN,L. y ARIAS, I.(1973).N.Engl.J.Med.288,11

698. WOLSTENHOLME,G.E.W. &MILLAR,E.C.P. (1955) Editors "Porphyrin Biosynthesis and Metabolism" CIBA Foundation Symposium. J.& Churchill Ltd, London.

699. YARBRO, J.W.; KENEDY, B.J. y BARNUM, C.P. (1965) Proc.Natl. Acad. Sci. (U.S.) 53, 1033.

700. YUAN M. & RUSELL C.S. (1974). FEBS lett. 46,34 38.

701. ZAHALSKY, A.G.; HUTNER, S.H.; KEANE, M. y BURGER?R.M.(1962). Arch. Mikrobiol. 4, 36.

702. ZAHALSKY, A.C.; HUTNER, S.H.; KEANE, M. y BURGER,R.M.(1962) Arch. Mikrobiol. 42, 46.

703. ZAMAN, Z.; ABBOND, M. and AKHTAR, M.(1972).J.Chem.Soc.Chem. Comm.,1263.

704. ZANNOTTI, M. y CALDI, M.(1963)Boll Soc.Ital.Biol.Sper.39,489.

705. ZIELINSKI,R.E. y PRICE, C.A. (1978). Plant.Physiol. 61, 624.

706. ZIMMER, C.; TRIEBEL, H. y THRUM,H.(1967) Biochim.Biophys Acta 145, 742.