

Tesis de Posgrado

Porfiria experimental por hexaclorobenceno : Estudios sobre el mecanismo de producción de la porfiria

Wainstok de Calmanovici, Rosa

1982

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:

Wainstok de Calmanovici, Rosa. (1982). Porfiria experimental por hexaclorobenceno : Estudios sobre el mecanismo de producción de la porfiria. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1728_WainstokdeCalmanovici.pdf

Cita tipo Chicago:

Wainstok de Calmanovici, Rosa. "Porfiria experimental por hexaclorobenceno : Estudios sobre el mecanismo de producción de la porfiria". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1982.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1728_WainstokdeCalmanovici.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA

PORFIRIA EXPERIMENTAL POR HEXACLOROBENCENO

ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE
PRODUCCION DE LA PORFIRIA

ROSA WAINSTOK DE CALMANOVICI

Director: Dra. Leonor San Martín de Viale.

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1728

1728
1728

A mis padres.

A mi esposo.

A mis hijos.

AGRADECIMIENTOS.

A la Dra. Leonor C. San Martín de Viale por su interés y dedicación y por facilitarme los medios necesarios para poder realizar esta investigación.

A mis compañeros de Laboratorio, por su colaboración, en especial a M. del C. Ríos de Molina, M. C. Taira y M. del C. Vila.

A la Sra. Carmen Aldonatti de Olivar que ha colaborado con gran dedicación y eficiencia en el desarrollo de la parte técnica.

Al Dr. J. M. Castagnino y al Dr. L. García Vior por facilitarme algunos aparatos.

Al Sr. F. Ortega y Srta. H. Gasparoli por su colaboración en el cuidado de los animales.

A la biblioteca de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, en especial a su directora, la Srta. V. Trucco.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por haberme permitido realizar esta investigación.

A la Sra. Liliana Inés Vázquez por el trabajo dactilográfico.

A mis padres y esposo por su constante estímulo.

ABREVIATURAS.

Uro: uroporfirina.

Firia: firiaporfirina.

Hexa: hexaporfirina.

Penta: pentaporfirina.

Copro: coproporfirina.

Proto: protoporfirina.

Uro'gen: uroporfirinógeno.

Penta'gen: pentaporfirinógeno.

Copro'gen: coproporfirinógeno.

Proto'gen: protoporfirinógeno.

Isocopro'gen: isocoproporfirinógeno.

Dehidroisocopro'gen: dehidroisocoproporfirinógeno.

ALA: ácido delta amino levúlico,

PBG: porfobilinógeno.

Succinil CoA: succinil-coenzima A,

ALA-S: ALA-sintetasa.

ALA-D: ALA-dehidrasa.

PBG-asa: porfobilinogenasa.

PBG-D: porfobilinógeno-deaminasa.

Uro-CoS: uroporfirinógeno cosintetasa.

Uro-D: uroporfirinógeno decarboxilasa.

Copro-D: coproporfirinógeno decarboxilasa.

Proto-O: protoporfirinógeno-oxidasa,

Hemo-O: hemo-oxigenasa.
HCB: hexaclorobenceno.
PCF: pentaclorofenol,
FB: fenobarbital.
TCH: tetraclorohidroquinona.
PCTF: pentaclorotiofenol.
TCTF: tetraclorotiofenol.
PCTA: pentaclorotioanisol.
TCTA: tetraclorotioanisol,
TCdi-TA: tetracloroditioanisol.
TCF: tetraclorofenol.
PCB: pentaclorobenceno,
TCB: tetraclorobenceno.
PCTA-O: pentaclorotioanisol sulfóxido.
PCTA-O₂: pentaclorotioanisol sulfona.
AIA: alil isopropil acetamida.
TCDD: 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina.
DDC: 3, 5 dietoxicarbonil-1, 4 dihidrocolidina.
DF: desferrioxamina.
EDTA: ácido etilendiamino tetraacético,
GSH: glutation.
CySH: cisteína.
SDS: dodecil sulfato de sodio.
DMSO: dimetilsulfóxido.
TCA: ácido tricloroacético.

PM: peso molecular.

PCT: porfiria cutánea tarda.

Me: $-\text{CH}_3$.

Et: $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$.

A: $-\text{CH}_2-\text{COOH}$.

P: $-(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$

V: $-\text{CH} = \text{CH}_2$

INTRODUCCION

I. BIOSINTESIS DE HEMO.

En la Fig. 1 se ven los pasos que llevan a la biosíntesis de hemo. En el primer paso, se combina glicina y succinil-coenzima A (Succinil-CoA), en la mitocondria, para formar ácido delta amino levúlico (ALA). La síntesis de ALA es catalizada por ALA-sintetasa (ALA-S). La enzima citoplasmática, ALA-dehidrasa (ALA-D) cataliza la condensación de 2 moléculas de ALA, formando el monopirrol porfobilinógeno (PBG). La síntesis del primer tetrapirrol de este camino requiere la acción de 2 enzimas: uroporfirinógeno I sintetasa, llamada también porfobilinógeno-deaminasa (PBG-D); y uroporfirinógeno III cosintetasa, llamada también uroporfirinógeno isomerasa (Uro-CoS) las cuales utilizan 4 moléculas de PBG como sustrato; PBG-D, en ausencia de Uro-CoS puede sintetizar sólo el isómero uroporfirinógeno I (Uro'gen I) el cual no es utilizado para la formación de hemo. En el citoplasma las cuatro cadenas de ácido acético del Uro'gen III son secuencialmente decarboxiladas por la enzima uroporfirinógeno decarboxilasa (Uro-D) dando coproporfirinógeno (Copro'gen). La formación enzimática de los grupos vinilo de protoporfirinógeno IX (Proto'gen IX) ocurre por la modificación de 2 de los cuatro sustituyentes propiónicos del copro'gen III, en la mitocondria. Esta reacción es catalizada por la enzima coproporfirinógeno decarboxilasa (Copro-D). La protoporfirina IX (Proto IX) se forma por deshidrogenación del Proto'gen IX catalizada por la enzima protoporfirinógeno oxidasa (Proto O).

La producción de hemo se realiza mediado por la enzima mitocondrial

FIG. 1. ESQUEMA DE LOS PASOS EN LA BIOSINTESIS DEL HEMO Y SU COMPARTIMENTALIZACION.

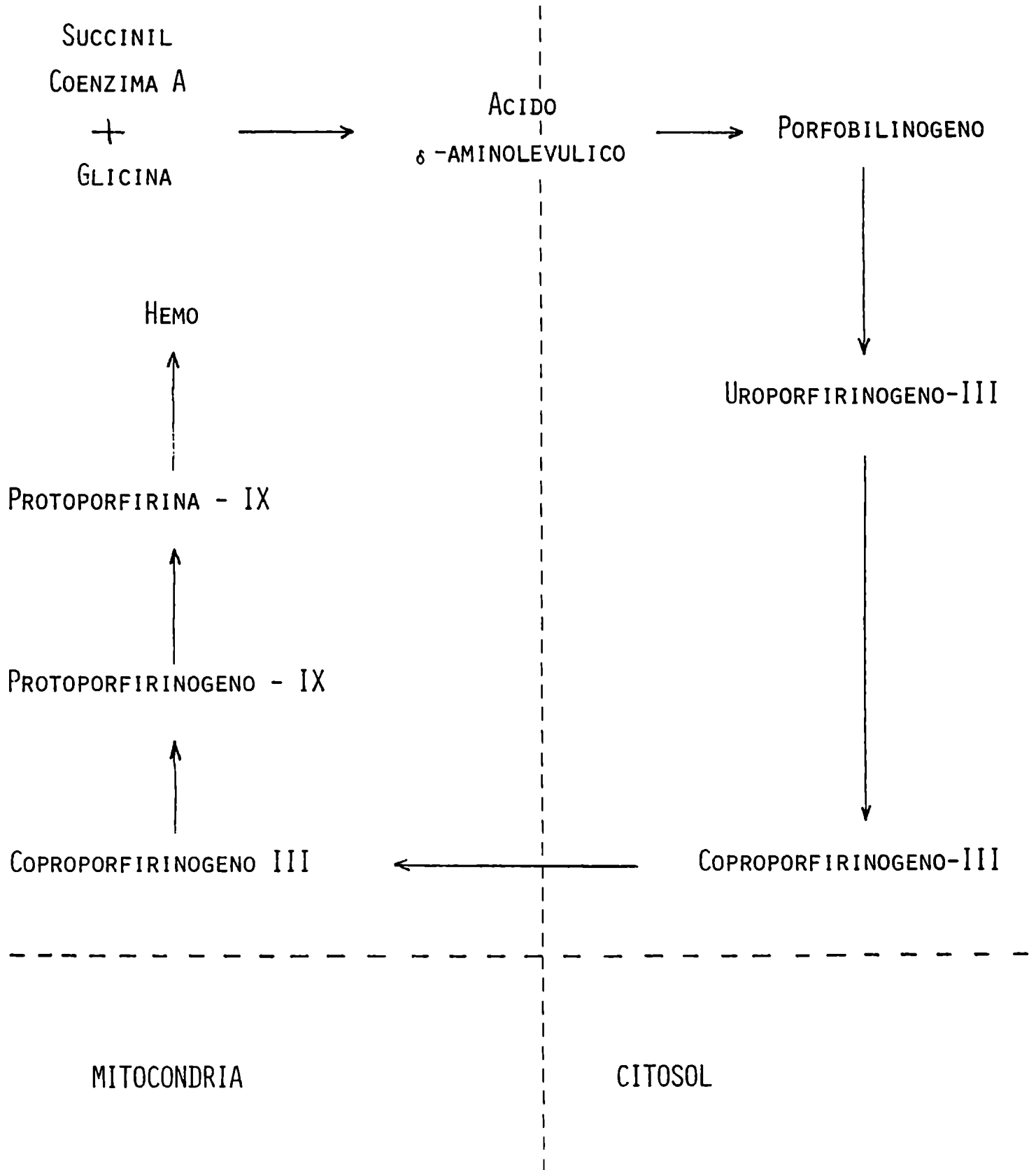
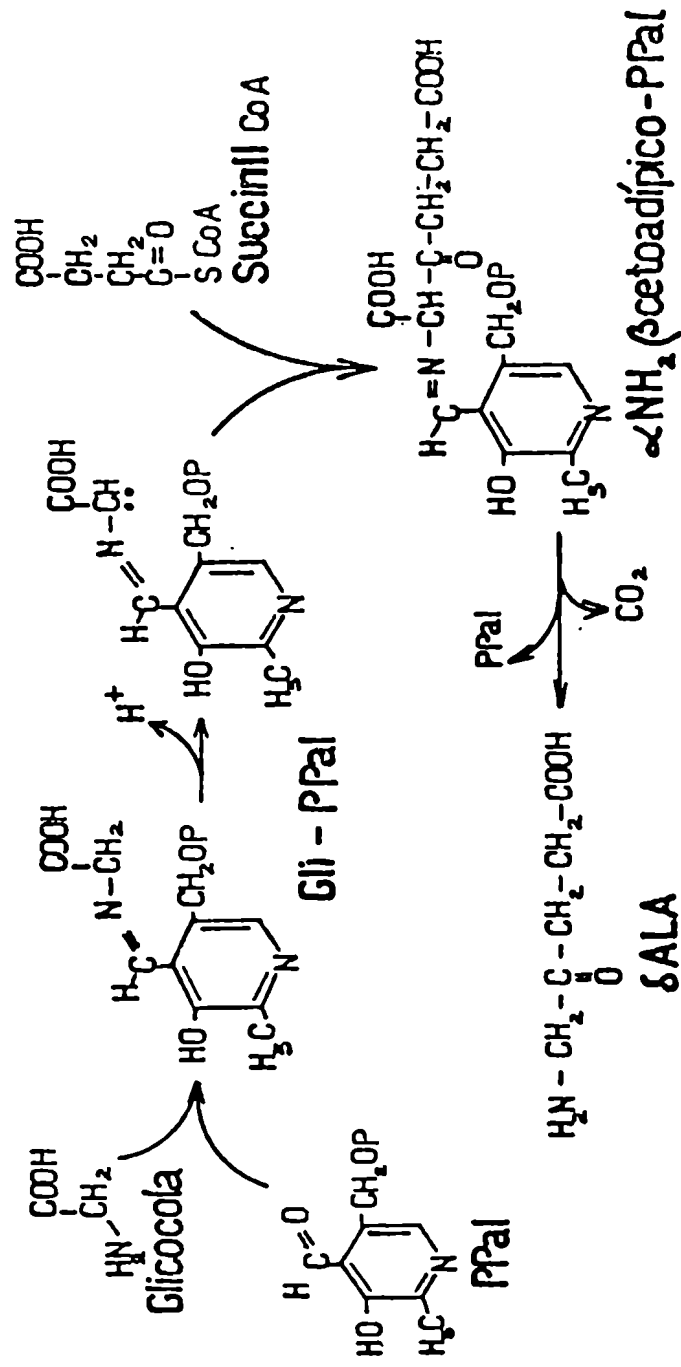


Fig.2 MECANISMO DE FORMACION DE ALA POR ACCION DE ALA-S PROPUESTO POR AKHTAR Y JORDAN (8)



ferroquelatasa la cual inserta hierro (Fe^{+2}) en el anillo de Proto IX para formar hemo.

I.1. Formación de ALA.

I.1.a. Mecanismo de acción de ALA-S.

Las primeras evidencias de que una molécula compleja como la Proto IX puede ser sintetizada a partir de moléculas pequeñas se obtuvo al demostrarse la incorporación en hemo de glicina- N^{15} , suministrado a ratas y humanos (1).

El primer compuesto estable formado en la biosíntesis de hemo es ALA (1, 2). Este compuesto es sintetizado enzimáticamente por la acción de ALA-S, la enzima limitante de la velocidad de este camino, Utiliza glicina y succinil CoA como sustratos (3-5) y presenta un requerimiento de fosfato de piridoxal como cofactor (6, 7). En la reacción se produce además de ALA, CO_2 y coenzima A.

Se ha propuesto un mecanismo de reacción (8) según el cual se formaría primero un carbanión estable a partir de glicina y fosfato de piridoxal, el que reaccionaría con el átomo de carbono electrofílico del carbonilo de la Succinil-CoA para producir ácido α -amino β -cetoadípico, y luego perdiendo CO_2 llegaría a ALA. El problema es decidir si el ácido α -amino β -cetoadípico se forma y descarboxila unido a la enzima o lo hace libre en solución, pero además si es o no un intermediario real, puesto que es posible que la condensación y la descarboxilación ocurran al

mismo tiempo (Fig. 2).

En base al conocimiento actual de las reacciones de transformación de aminoácido en las cuales participa el fosfato de piridoxal, se pueden postular dos tipos de mecanismos para la biosíntesis de ALA a partir de glicina y Succinil-CoA (Fig. 3 y Fig. 4). En ambos, se formaría al principio una base de Schiff entre la enzima unida al fosfato de piridoxal y la glicina [2] (Fig. 3 y Fig. 4). Esta unión altera las propiedades de los grupos C-H y -COOH de la glicina, labilizando uniones que son muy estables en el aminoácido primitivo como consecuencia de la atracción de electrones por el núcleo piridínico. Se supone que en reacciones dependientes de fosfato de piridoxal la propiedad de atracción de electrones puede verse exaltada por la presencia, en el sitio activo de la enzima, de un grupo capaz de protonar al N de la piridina, como se muestra en [2] (Fig. 3 y Fig. 4). En el mecanismo 1 se ha postulado que una reacción de decarboxilación formaría el carbanión [4] (Fig. 3), el que se condensaría con Succinil-CoA dando una base de Schiff de ALA encadenado a la enzima unida al fosfato de piridoxal [5] (Fig. 3) complejo que por hidrólisis produciría ALA libre (Fig. 3).

En el mecanismo 2 (Fig. 4) el primer paso sería la eliminación de un protón para dar otro tipo de carbanión [7 \leftrightarrow 8] (Fig. 4) el que reaccionaría con succinil-CoA quedando los seis átomos de los sustratos encadenados al complejo enzima-fosfato de piridoxal

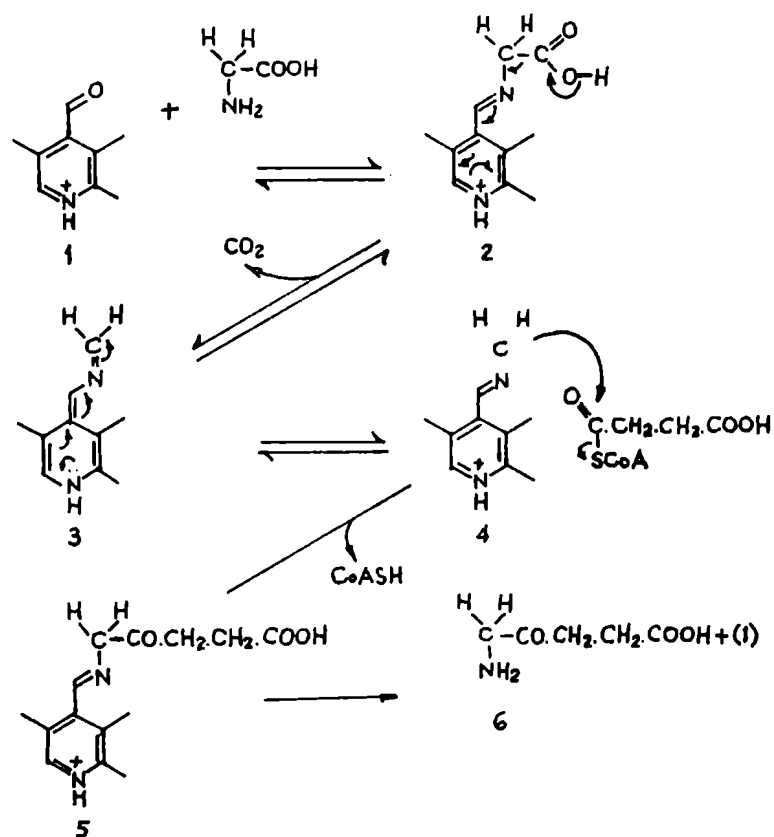
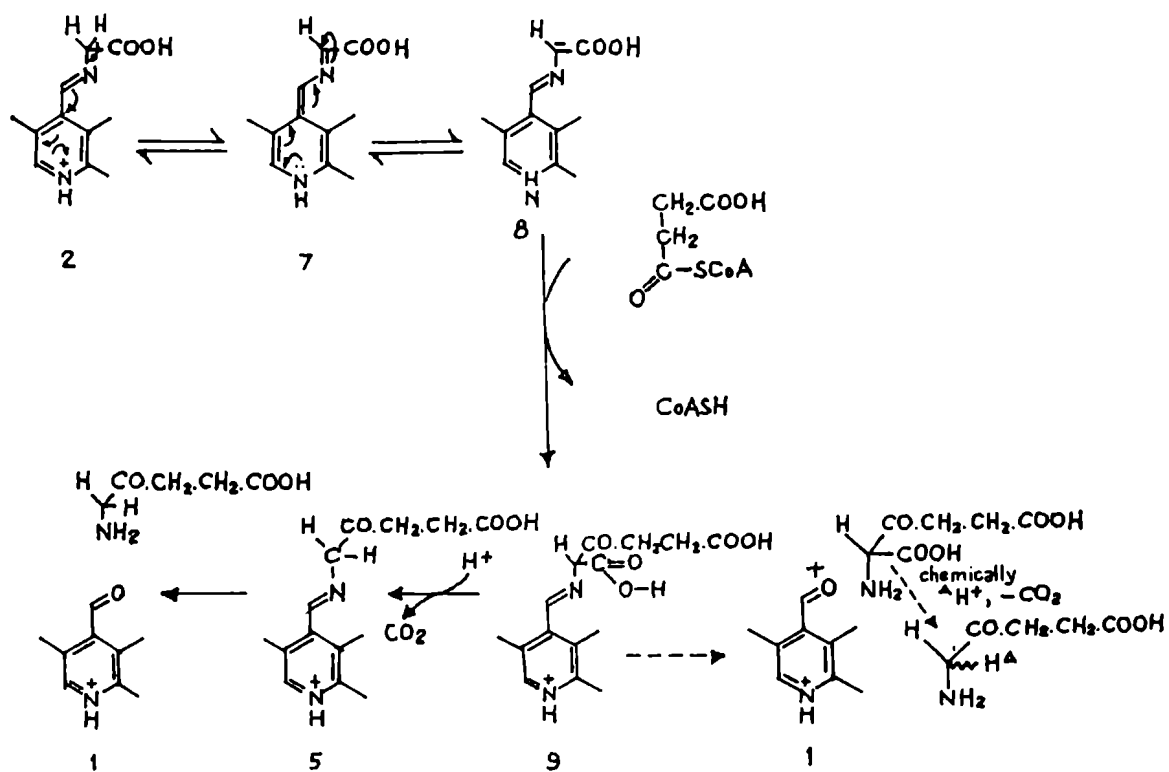


Fig. 4 MECANISMO 2a (→) Y 2b (---) PARA LA REACCION DE ALA-S (9)



como ácido α -amino β -cetoadípico [9] (Fig. 4). Ahora habría dos alternativas para la formación de ALA: en una (mecanismo 2a) ocurriría una descarboxilación, por la presencia de un grupo beta-carbonilo, resultando un complejo enzima-fosfato de piridoxal-ALA [5] (Fig. 4) el que por hidrólisis produciría ALA libre. La otra alternativa involucra la hidrólisis del intermediario [9] (Fig. 4) liberando ácido α -amino β -cetoadípico, que se descarboxilaría no enzimáticamente produciendo ALA.

Para determinar el verdadero mecanismo de la reacción de ALA-S se prepararon glicinas marcadas estereoespecíficamente con tritio (9, 10).

Con estos experimentos se pudo determinar que la formación de ALA debe ser a través del mecanismo 2 a,

I.1.b. Propiedades bioquímicas de ALA-S,

La enzima ALA-S ha podido ser detectada en numerosas células animales, vegetales y bacterias así entre otros en eritrocitos de aves normales (11), en bacterias fotosintéticas (4, 12-14), en reticulocitos humanos (15) en mitocondrias de glándula de Harder de ratas normales (16), en extractos de callos de semillas de soja (17) y en homogenatos de hígados de ratas normales y porfiricas (18). Se estudió la enzima proveniente de varios sistemas y se informó que la ALA-S era mitocondrial (19-22) pero luego se la encontró también en el citosol (22, 23-26),

La enzima citoplasmática ALA-S fué purificada parcialmente por Scholnik y col. (25). Esta enzima requiere cationes monovalentes o divalentes para su máxima actividad (25) y exhibe valores de K_m aparente para glicina, Succinil-CoA y fosfato de piridoxal de 1×10^{-2} , 7×10^{-5} y 3×10^{-6} M respectivamente. No se puede medir actividad cuando se reemplaza glicina por alanina o serina en el medio de incubación.

La enzima posee también especificidad por Succinil-CoA; reemplazando esta por propionil-coenzima A se forma aminoacetona a una velocidad menor que el 1% respecto a su sustrato normal(25). Se informaron distintos pesos moleculares (PM) para la enzima citosólica de hígado de rata. Así se encontró (25) un PM de 300,000 en presencia de ClNa y 500.000 en ausencia de esta sal, por experimentos con gradientes de densidad en sacarosa,

Hayashi y col. (21) y Malcom y col. (22) determinaron un PM de 178,000 y Nakakuki y col. (27) determinaron un PM de 70,000 por filtración en gel. Estos últimos autores (27) informan para la misma enzima un PM de 110.000 cuando lo determinan por centrifugación en gradiente de Sacarosa, coincidiendo con el PM determinado de la misma forma por Ohashi y col. (28),

Hayashi y col. (21) encontraron que la ALA-S mitocondrial de hígado de rata tiene un PM de 113,000 mientras que Malcom y col. (22) determinaron para la misma un PM de 77,000 por filtración en gel.

En estudios recientes (28, 29) se determinó que la ALA-S citosólica (28) y mitocondrial (29) respectivamente era un dímero formado por monómeros de PM 51.000 según Ohashi y col. (28) y de 58.000 según Simpson y col. (29). Los mismos autores informan que el dímero tiene un PM de 110.000 (28) y de 118.000 (29). Estos resultados indicarían que el PM del componente proteico catalíticamente activo (28) de la ALA-S citosólica es aparentemente el mismo que el de la ALA-S mitocondrial y de que la forma dimerica de la proteína está compuesta por 2 subunidades idénticas. Tanto la ALA-S citosólica como la mitocondrial están constituidas por complejos de alto PM (29).

Estos complejos están formados por proteínas catalíticamente activas y por otras catalíticamente inactivas (28), formandose agregados entre dichas proteínas (22, 30).

Jamauchi y col. (31) indujeron ALA-S en hígado de ratas por administración de alil isopropil acetamida (AIA) y realizaron estudios cinéticos sobre la transferencia de ALA-S del citosol a la mitocondria. Concluyen que la ALA-S la cual se acumula en la fracción citosólica del hígado por inducción, es un precursor en tránsito a la mitocondria (22, 26, 27, 31) y de que la hemina inhibe la translocación intracelular de ALA-S. Se determinó (27) que la enzima citosólica y mitocondrial son inmunológicamente idénticas lo cual avalaría la hipótesis de que la ALA-S es trasladada del citosol a la mitocondria.

Se purificó de mitocondria de hígado de rata una proteína capaz de activar la ALA-S mitocondrial (29). El activador fue purificado 6250 veces y se determinó que es homogéneo por su migración como banda única tanto en electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia y ausencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) como en geles de isoelectroenfoque. Se determinó que el PM del activador es 57,000 por cromatografía en gel y 54,000 por electroforesis en gel con SDS (29).

Es posible (29) que el activador sea una de las proteínas catalíticamente inactivas asociadas a la ALA-S en el citosol y que su modo de acción sea el de formación de agregados de alto PM de ALA-S a partir de monómeros catalíticos.

I.1.c. Regulación de la actividad de ALA-S.

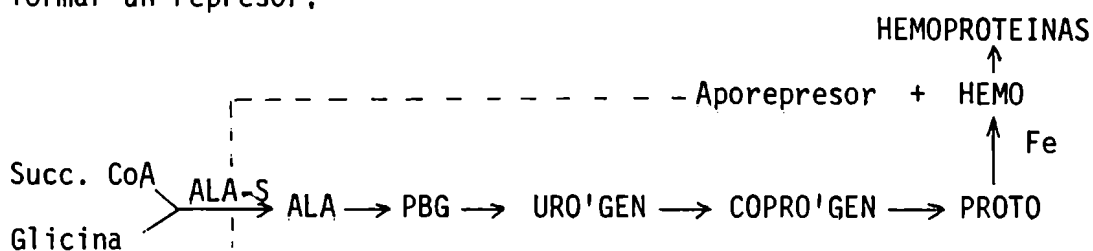
Estudios de Granick y col, (32) proveen evidencias de que el hemo está involucrado en la regulación por feedback negativo de ALA-S hepática. Estos efectos fueron documentados previamente en bacterias. Se propusieron 3 modos diferentes de regulación por feedback: (1) inhibición por feedback de ALA-S por hemo; (2) represión por feedback de la síntesis de ALA-S por hemo; y (3) inhibición por hemo de la transferencia de la ALA-S citosólica soluble a la mitocondria.

La inhibición de la actividad de ALA-S por hemo fué demostrada con concentraciones de hemo entre 10^{-4} M y 10^{-5} M. En homogenatos de hígado entero no se encontró inhibición (32) pero esto no exclu-

ye la posibilidad de una yuxtaposición de la primera y la última enzima de la síntesis de hemo (ALA-S y ferroquelatasa) en la mitocondria. Concentraciones locales de hemo formado endógenamente pueden llegar a niveles suficientemente altos para ejercer un efecto inhibitorio sobre ALA-S.

Experimentos de Sinclair y Granick (33) en cultivos de células sugieren que la represión por feedback de la ALA-S puede ocurrir a concentraciones de hemo tan bajas como 10^{-7} y 10^{-8} M.

El control por represión enzimática (34) permite una regulación económica de los pasos metabólicos debido a que es innecesaria formación de nueva proteína. De acuerdo al modelo de Jacob y Monod (32) propuesto sobre la base de estudios sobre bacterias, la molécula de hemo puede reaccionar con una sustancia aporepresora para formar un represor.



El represor impide la síntesis del mensajero RNA que codifica a la ALA-S.

Kurashima y col, (35) proponen de que el hemo puede interferir con la transferencia de nueva enzima sintetizada, de los polirribosomas a la mitocondria

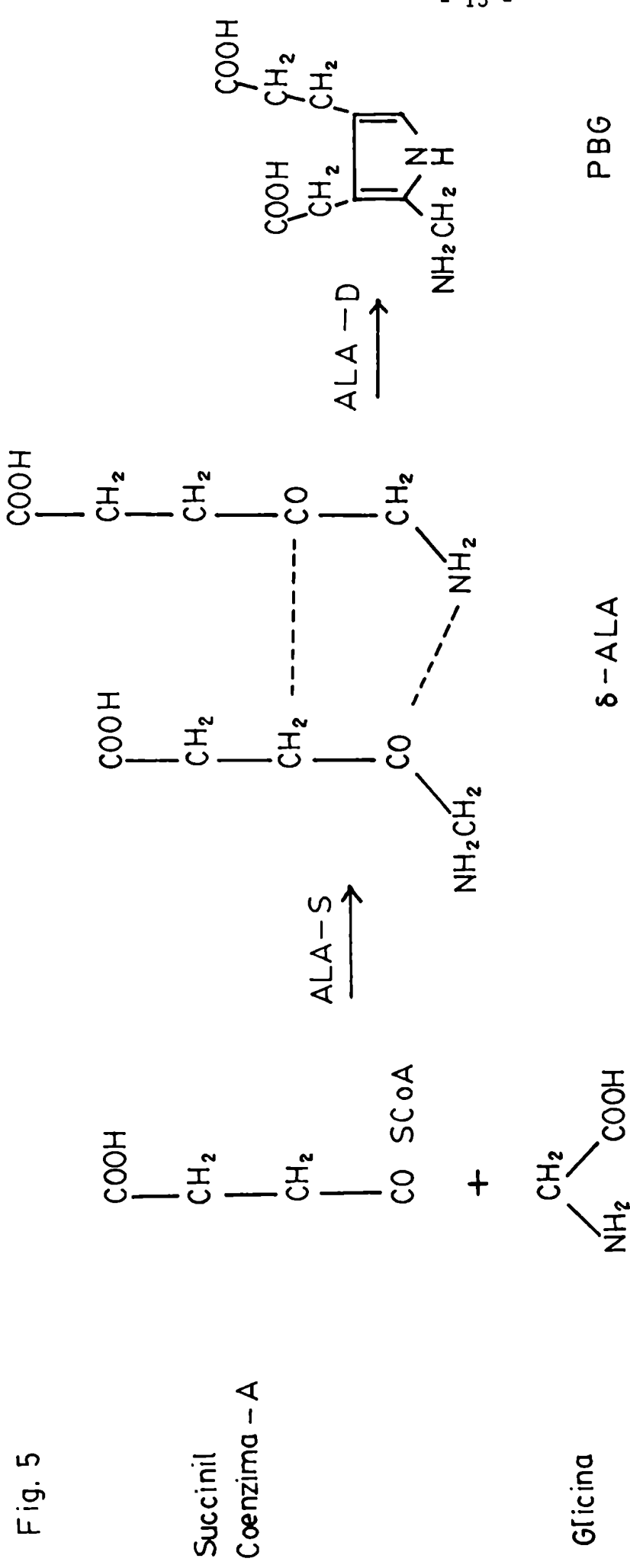
I.2. Biosíntesis de PBG.

La enzima ALA-D cataliza la condensación de 2 moles de ALA para dar el pirrol PBG (Fig. 5). Esta enzima citosólica fué purificada de un gran número de fuentes (36-38). ALA-D es una enzima sulfhidrónica y es sensible a reactivos tiólicos y a metales pesados (39-41). Los inhibidores de grupos sulfhidrónicos como iodoacetamida y p-cloromercuribenzoato tienen un efecto inhibitorio, el cual puede ser obviado por la adición de glutatión (GSH), β mercaptoetanol, cisteína (CySH), ditiotreitól y otros activadores de la enzima (39-41).

Se observó marcada inhibición de ALA-D de distintas fuentes de mamíferos con agentes quelantes como el ácido etilendiamino tetracético (EDTA). Estudios con enzima purificada sugieren que el zinc es esencial para la actividad enzimática. La purificación de la enzima y el tratamiento con quelantes lleva a una apoenzima libre de metales la cual puede ser activada por la adición de zinc (42). ALA-D tiene un PM de 280.000 y está compuesta de 6 u 8 subunidades similares (43-45). Solo cuatro de las 8 subunidades reaccionan con el sustrato formando un complejo base de Schiff con 1 mol de ALA.

La ALA-D humana fué purificada 9.000 veces resultando ser una proteína electroforéticamente e inmunológicamente pura (46). El pH óptimo de la enzima es 6.6 y su K_m para ALA 4.8×10^{-4} M. El zinc es una porción de la molécula enzimática, el cual se pier-

Fig. 5



BIOSINTESIS DE PBG

de en parte por la purificación, su adición incrementa la actividad enzimática. Las determinaciones de PM y microscopía electrónica están a favor de una estructura octamérica (46).

Nandi y Shemin (47) propusieron un mecanismo para la síntesis de PBG, basándose en que la enzima posee un residuo de lisina en el sitio activo, postulando la formación de una base de Schiff con la molécula de ALA, la cual formaría la cadena de ácido acético del PBG formándose una unión no covalente con la otra molécula de ALA, la cual formaría la cadena de ácido propiónico (Fig. 6). Se encontró que para la actividad enzimática ^{es} esencial un residuo de histidina (48, 49).

Shemin y col, (48) propusieron un nuevo mecanismo para la síntesis de PBG. En este mecanismo (Fig. 7) postulan que los grupos sulfhidrilo de residuos cisteínicos en el sitio activo de la enzima pueden participar en la catálisis ácido-base necesaria para los requerimientos de las secuencias de protonación-desprotonación. Cada grupo (B^- o BH) (anión tiolato o tiol posiblemente) debe alternarse como ácido y base durante la catálisis,

I.3. Biosíntesis de Uro'gen III,

La enzima que cataliza la formación de Uro'gen III, se conoce con el nombre de "Porfobilinogenasa" (PBG-asa) complejo formado por PBG-D y Uro-CoS. Este complejo se halla constituido por lo menos por 2 actividades enzimáticas distintas, cuya característica diferencial

Fig. 6 MECANISMO DE FORMACION DE PBG POR ACCION DE ALA-D
PROPUESTO POR NANDI Y SHEMIN (47)

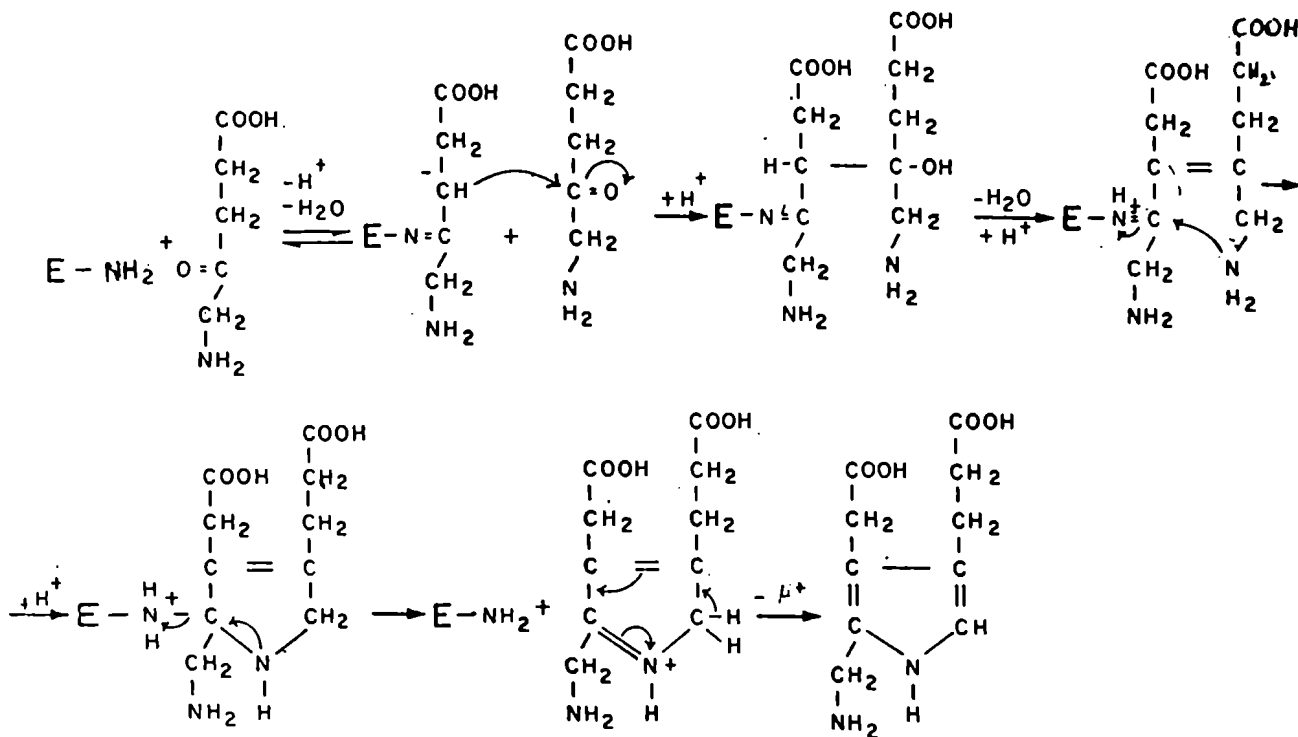
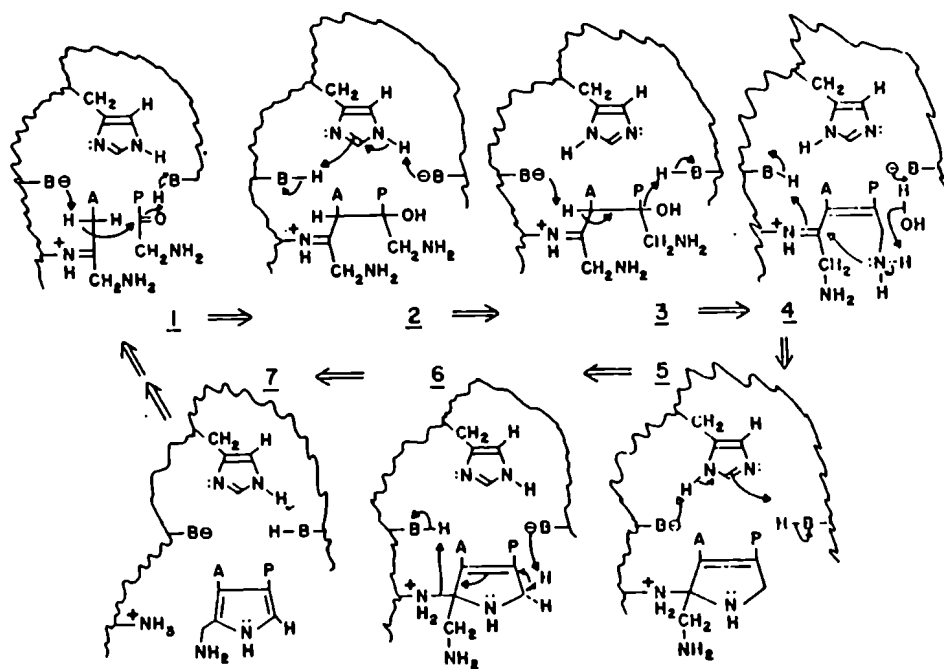


Fig. 7 MECANISMO DE FORMACION DE PBG POR ACCION DE ALA-D
PROPUESTO POR SHEMIN Y COL. (48)



más importante es su sensibilidad al calor. La componente termoestable es la PBG-D que cataliza la conversión de PBG en Uro'gen I. Para la formación de Uro'gen III se necesita además de la componente termolabil que es la Uro-CoS (Fig. 8).

La PBG-asa ha sido purificada de eritrocitos de pollo (40), de reticulocitos de conejo (40), de eritrocitos inmaduros (40), de eritrocitos humanos (50), y de callos de semilla de soja (51); en todos los casos se encuentra en la fracción soluble del citoplasma.

Se ha determinado el PM de la PBG-asa purificada de callos de semillas de soja (51) que resultó ser 22.000 ± 2.200 y para la enzima de eritrocitos de pollo (52) 110.000 ± 11.000 .

En el caso de la enzima purificada de callos de semilla de soja y de eritrocitos de pollo, se pudieron desdoblar y reconocer las dos actividades de la enzima purificada (51, 52). En los otros casos (40, 50) la enzima se comportó como una entidad proteica única, por fraccionamiento electroforético ya sea sobre gel de almidón o sobre gel de poliacrilamida.

El pH óptimo de la PBG-asa varía entre 7.2 y 8.1 según su origen. Para la enzima purificada de eritrocitos de pollo resultó ser 7.4 (40) para la de reticulocitos de conejo 7.8 (40), para la de eritrocitos humanos 8.1 (50) y para la de callos de semilla de soja 7.2 (51).

La enzima es activa tanto en anaerobiosis (40, 51, 52) como en aerobiosis (40, 50, 52). La enzima es sulfhidrífica y se inac-

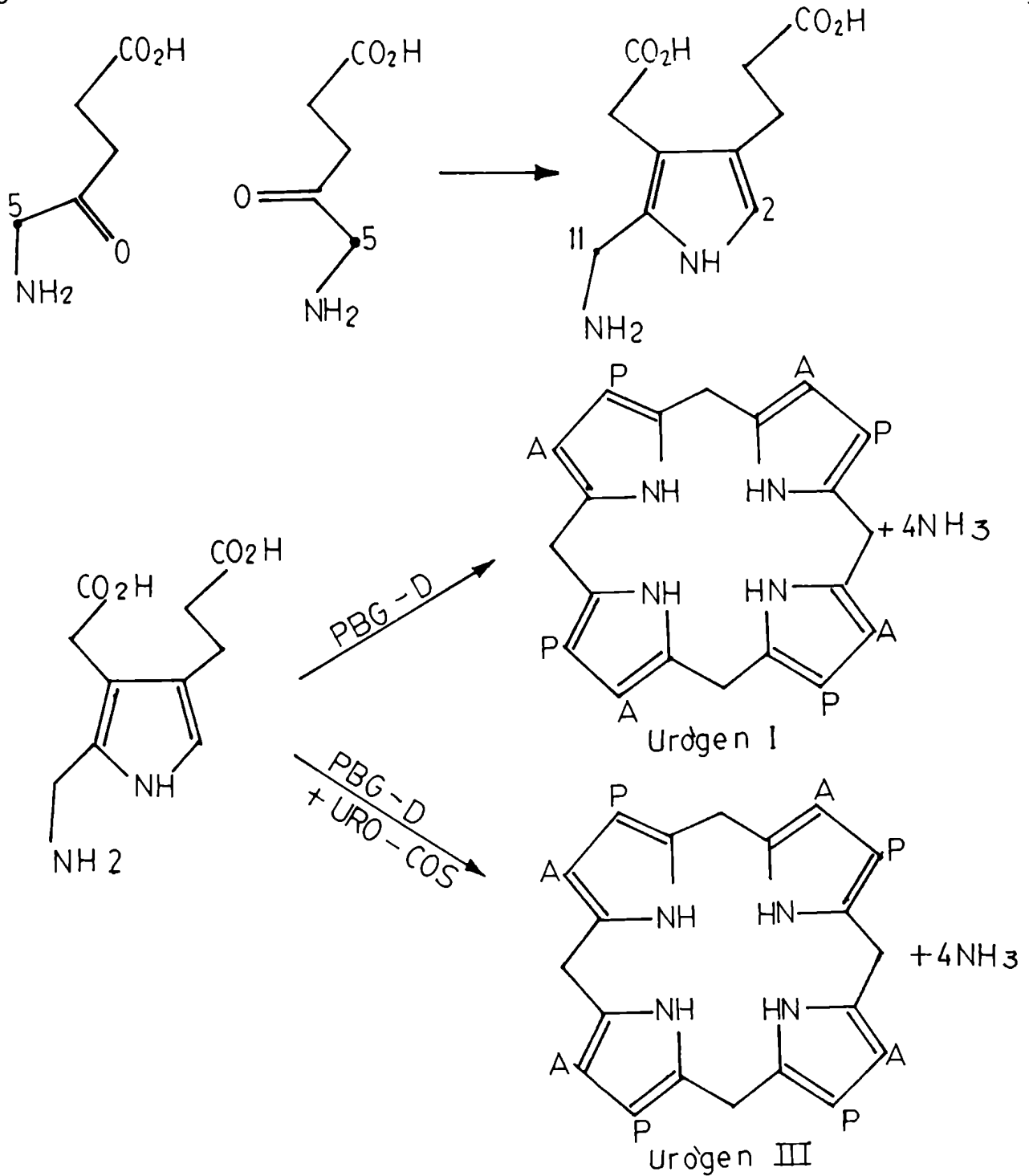
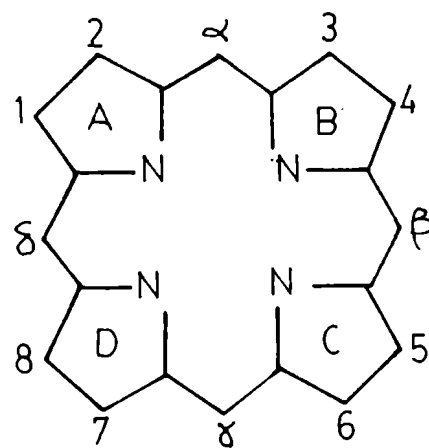


Fig. 9 NOMENCLATURA DE FISCHER PARA NUMERAR LAS PORFIRINAS.



tiva por p-cloromercuribenzoato, mercurio, cobre y cadmio (40,52).
CySH , tioglicolato y GSH inhiben parcialmente la actividad enzimática (40), HONH_2 y NH_4^+ inhiben la enzima (52, 53), y la inhibición se refleja sobre la producción de Uro'gen III

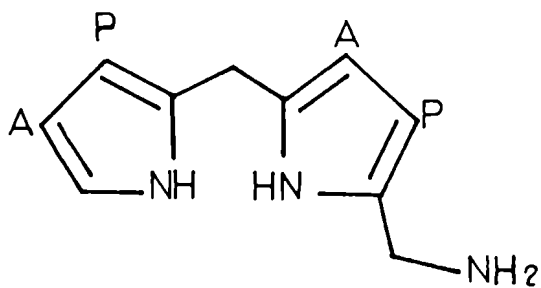
El sodio activa la PBG-asa (50-51) y disminuye la proporción de Uro'gen I, de un sistema que produce Uro'gen I y III (50).

La producción de Uro'gen III requiere que el complejo deaminasa-isomerasa sea capaz de romper la unión de uno o más de uno de los grupos metilénicos de C_{11} (Fig. 8) de las 4 moléculas de PBG que lo formarán. Por lo tanto existirían, 24 caminos diferentes por los cuales 4 moléculas de PBG podrían formar Uro'gen III. En los 24 reordenamientos posibles los 4 puentes metilénicos en el Uro'gen III ($\text{C } \alpha$; β ; γ y δ) (Fig. 9) difieren en su origen respecto a la posición previa de la molécula de PBG (54).

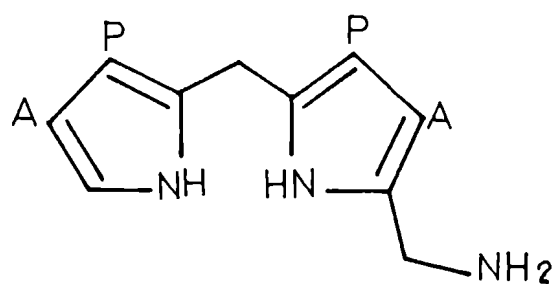
Por biosíntesis de Uro'gen III con $\left[2,11 - {}^{13}\text{C}_2\right]$ PBG se determinó que sólo el puente C_{15} o sea el puente metilénico γ provenía de un reordenamiento, en tanto que en la biosíntesis de Uro'gen I catalizado por PBG-D ninguno sufría reordenamiento; se determinó que el reordenamiento no se producía a nivel de monopirrol (55). Para determinar si era a nivel de dipirrol se utilizaron los 4 posibles dipirrol metanos I, II, III y IV (Fig. 10) en presencia de PBG, como sustrato del sistema deaminasa-isomerasa.

Se determinó que tanto el dipirrol I como el II no son incorpora-

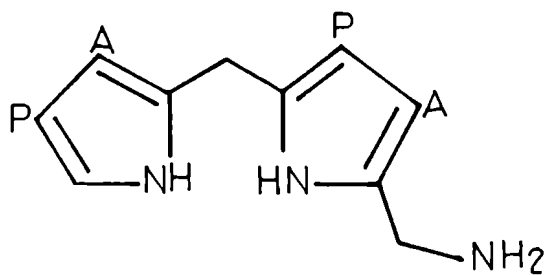
Fig.10 ESTRUCTURAS PROBABLES DE DIPIRRILMETANOS PARA LA SINTESIS DE UROGEN III



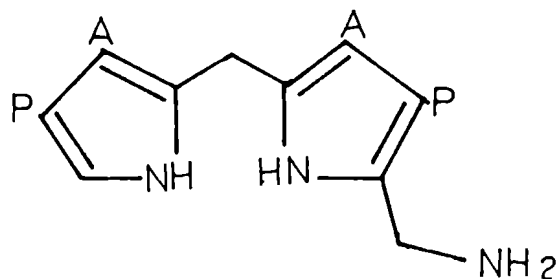
I



II

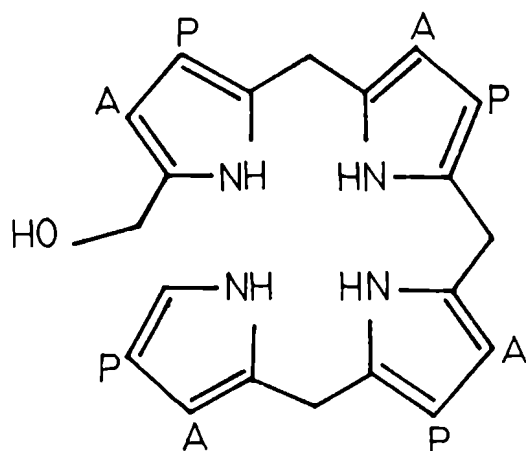


III

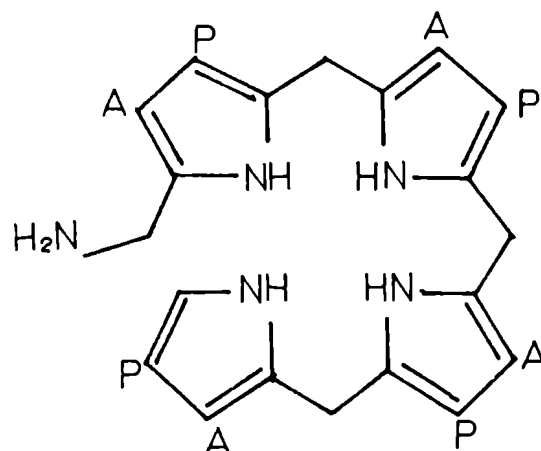


IV

Fig.11 ESTRUCTURAS PROBABLES DE BILANOS PARA LA SINTESIS DE UROGEN III



a



b

dos pero hay discrepancias en cuanto a la incorporación de los dipirrilmetanos III y IV (56-59).

Los trabajos de Fridman indican que el dipirrol III es sólo incorporado en Uro'gen I por PBG-D y no por el sistema deaminasa-isomerasa que incorpora el IV (57) sugiriendo que el reordenamiento se produce en la formación del dipirrilmetano, es decir al comienzo de la biosíntesis. Battersby (56) encontró sólo incorporación de III en el Uro'gen por el sistema deaminasa isomerasa sugiriendo que el reordenamiento se produciría a "posteriori". Trabajos posteriores (60) demostraron que el bilano b (Fig.11) resultó el mejor sustrato para el sistema deaminasa-isomerasa.

El grupo de Scott (61-63) encontró por estudios de resonancia magnética nuclear (NMR¹³C) la existencia de un intermediario que denominaron pre-Uro'gen, que se convertía espontáneamente en Uro'gen I y luego en Uro'gen III. Estos autores (61-63) también sugieren que el precursor del pre-Uro'gen sería un bilano del tipo a o b (Fig. 11).

Finalmente se ha sintetizado el bilano a (Fig, 11) teniendo como sustituyente el grupo OH el cual es sustrato de la isomerasa y producto de la deaminasa (64).

De acuerdo con estos estudios (54, 64) se determinó que las 3

moléculas de PBG que forman los anillos A, B y C con los correspondientes C- δ , C- α y C- β respectivamente son incorporadas todas en la misma forma, por unión del C-2 de una con el C-11 de la otra (Fig. 8).

La molécula de PBG que forma el anillo D (54) del Uro'gen III presenta un reordenamiento el cual se observa en la marcación del C- γ (Fig. 8 y Fig. 9). Estos resultados (54) se obtuvieron con espectros de resonancia magnética nuclear realizando las marcaciones con ^{13}C . Se determinaron señales idénticas (54) para los C de los puentes metilénicos α , β y δ y una señal distinta para el C γ (Fig. 9).

I.4. Transformación de Uro'gen III en Copro'gen III.

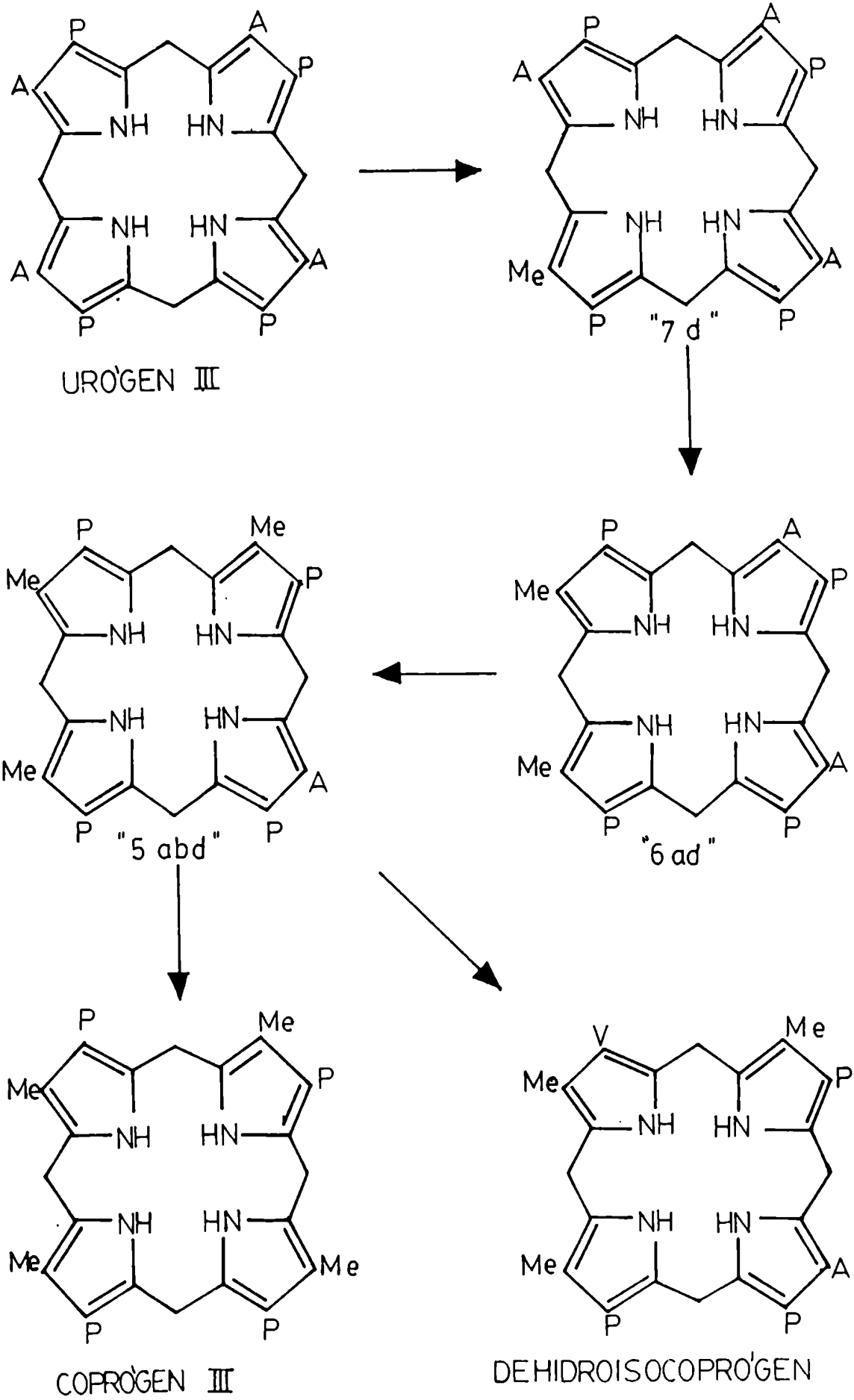
El Uro'gen III se transforma en Copro'gen III por acción del sistema enzimático Uro-D, Esta enzima fué estudiada en eritrocitos humanos (65, 66) en pollos (66-68), en hígado de rata (69) en bazo de ratón (70), en R. spheroides (71), en reticulocitos de conejo (72) y en Chlorella (73),

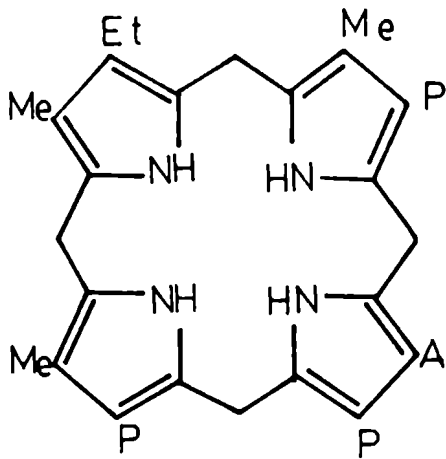
La estructura de las porfirinas aisladas y purificadas de heces de ratas intoxicadas con HCB (74) indican de que la decarboxilación del Uro'gen III es un proceso que ocurre en la dirección de las agujas del reloj. Esta decarboxilación parte del ácido acético del anillo D y procede a la degradación secuencial de los grupos acéticos de los anillos A, B y C (Fig. 9).

Se determinó que el porfirinógeno heptacarboxílico "7 d" era intermediario en la biosíntesis (Fig. 12), siendo una vez oxidado idéntico a la ~~hima~~porfirina obtenidas de heces de ratas intoxicadas con hexaclorobenceno (HCB). Demostraron luego que tiene la misma estructura que las porfirinas heptacarboxílicas excretadas por pacientes con porfiria sintomática. La estructura asignada a la porfirina pentacarboxílica "5 a b d" está también de acuerdo con la formación de dehidroisocoproporfirinógeno (Dehidroisocopro'gen) (Fig. 12 y Fig. 13).

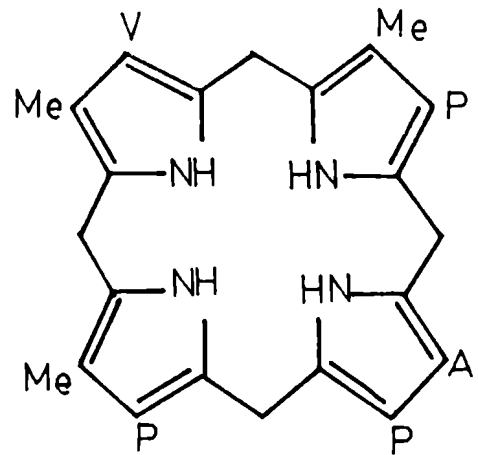
La porfirina pentacarboxílica "5 a b d" se acumula en pacientes con porfiria cutanea tarda (PCT)(75) y la transformación en Dehidroisocopro'gen puede ocurrir por descarboxilación oxidativa de la cadena de ácido propiónico de la posición 2 de la misma manera que la conversión de Copro'gen III a Proto'gen IX. El dehidroisocopro'gen puede potencialmente ser metabolizado a harderoporfirinógeno (Fig. 13) y luego a hemo (76). En la transformación de Penta'gen a Dehidroisocopro'gen (Fig. 12) intervendría la enzima Copro-D y en la transformación de Dehidroisocopro'gen a Harderoporfirinógeno (Fig. 13) intervendría la enzima Uro-D.

La dificultad para explicar esto es de que la Uro-D es una enzima citosólica mientras que la Copro-D es mitocondrial. Una posible explicación para la formación de Dehidroisocopro'gen es que el daño hepático en porfiria cutánea hepática y en intoxicación por HCB hace accesible a la enzima mitocondrial al porfirinógeno pentacarboxílico así como al Copro'gen III.

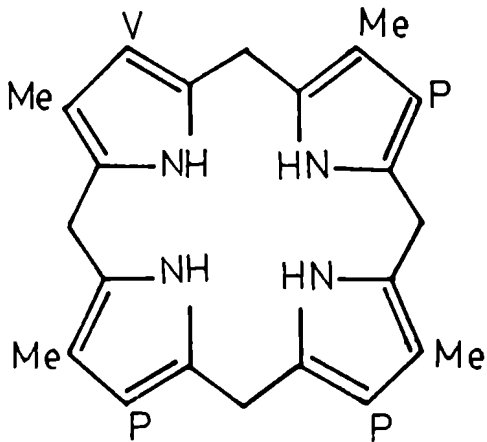




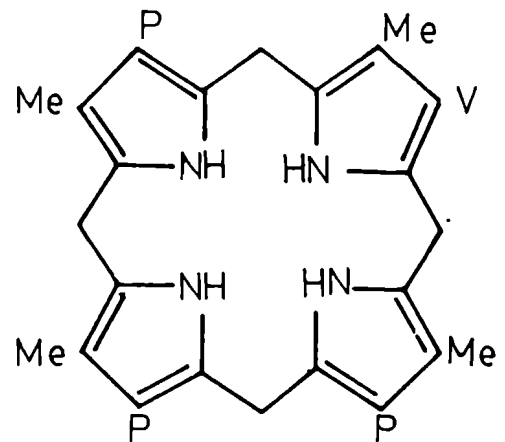
ISOCOPROGEN



DEHIDROISOCOPROGEN



HARDEROPORFIRINOGENO



ISOHARDEROPORFIRINOGENO

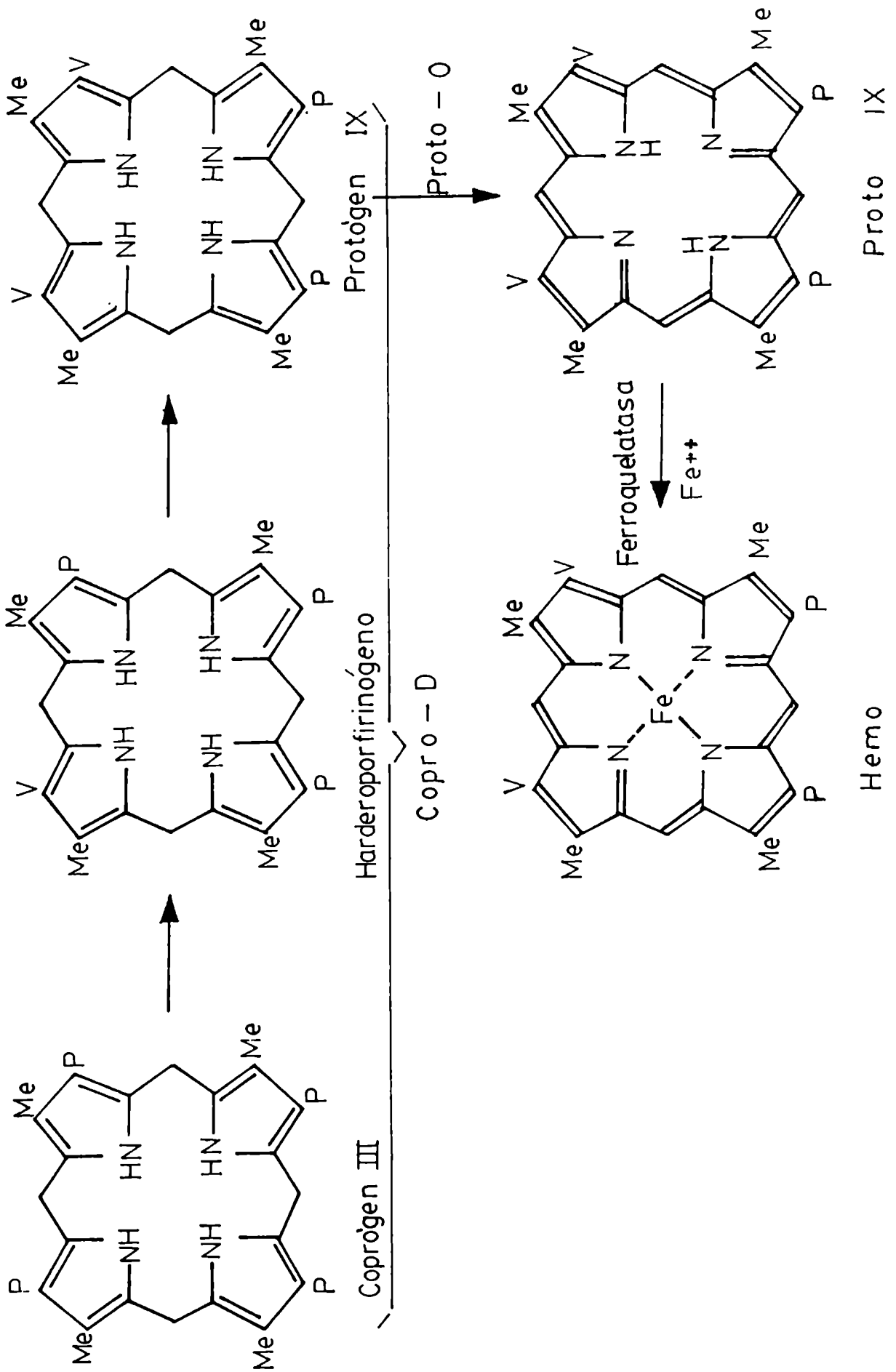
Los mayores intermediarios en procesos metabólicos normales y anormales son los porfirinógenos "7 d, 6 a d y 5 a b d" y el efecto del HCB es simplemente disminuir la velocidad total de decarboxilación (por reducción de la actividad de la enzima Uro-D).

I.5. Conversión de Copro'gen a Proto,

La biosíntesis de Proto IX a partir de Copro'gen III ocurre en 2 pasos en el cual participan 2 enzimas distintas (77). En el primer paso la Copro-D cataliza la descarboxilación y deshidrogenación del Copro'gen III a Proto'gen IX y en el segundo paso la Proto-O cataliza la remoción de 6 hidrógenos del núcleo de Proto'gen IX (Fig. 14). Este sistema enzimático es particulado y fué purificado por distintos investigadores (78, 79).

La Copro-D (78) fué estudiada de mitocondria de hígado de rata. Se encontró que el punto isoeléctrico era alrededor de 5.0 y el peso molecular de $80,000 \pm 8,000$. El K_m aparente era 0.03 mM y el pH óptimo 7.4. La enzima se destruye por calentamiento (78). En presencia de aire la conversión no depende de la presencia de un aceptor de H exógeno o de otros cofactores. Bajo condiciones anaeróbicas tiene un requerimiento absoluto de iones metálicos divalentes, ATP y L-metionina (79). Se inhibe por altas concentraciones de sales, agentes quelantes y reactivos sulfhidrúlicos. La Copro-D está ligeramente adherida a la superficie (80) de una de las membranas, en el espacio intermembrana, aunque no se puede excluir la localización de una pequeña porción den-

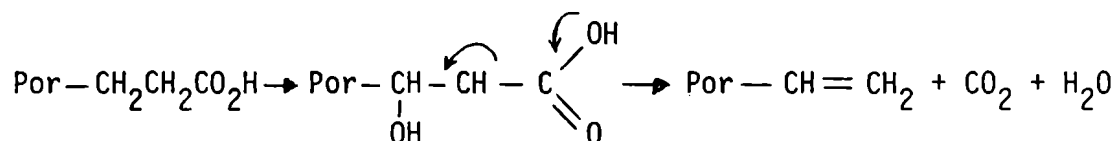
Fig.14 BIOSINTESIS DE HEMO A PARTIR DE COPRÒGEN III



tro de la membrana.

La biosíntesis de Proto IX a partir de Copro'gen III involucra la conversión de los restos de ácido propiónico de las posiciones 2 y 4 en vinilos y su oxidación a porfirina (81). Se sabe que en cada grupo de ácido propiónico el mecanismo de formación de los vinilos sucede en forma estereoespecífica (81).

El proceso sigue un mecanismo del tipo (77, 81)



La interpretación es consistente con proposiciones anteriores de Sano (82) que proponía una hidroxilación seguida de una deshidratación decarboxilativa. Consideraron que un compuesto hidroxilado podría ser el precursor de la Proto IX sugiriendo que ambos propiónicos son convertidos en hidroxipropionato antes que en vinilo. Se confirma el postulado de que la biosíntesis de Proto IX a partir de Copro'gen III procede por modificación del sustituyente del ácido propiónico de la posición 2 antes que del de la posición 4 (77, 81). Las porfirinas tricarbóxicas intermedias fueron caracterizadas de la glándula de Harder de ratas (81, 83, 16)

Se las denominó hardero e isohardero porfirinas (Fig. 13).

Se realizaron experimentos biosintéticos con hardero e isohardero porfirinógenos tritiados incubando ambos sustratos con un sistema enzimático de *Euglena gracilis* (83). Se determinó que el isohar-

deroporfirinógeno no fué aceptado por el sistema enzimático y se concluyó por lo tanto que el propionato de la posición 2 es modificado antes que el de la posición 4 (83).

I.6. Conversión de Proto IX a Hemo.

La introducción de hierro en la Proto IX está catalizada por la enzima ferroquelatasa (Fig. 14). El hierro, al igual que otros metales de transición, puede ser incorporado en porfirinas en forma química. Ha sido demostrada la incorporación química del hierro en porfirinas parcialmente reducidas (di y tetrahidroporfirinas) (84) pero no se ha demostrado la incorporación a porfirinógenos. En medios biológicos, no se ha encontrado incorporación a porfirinógenos ni a porfirinas parcialmente reducidas (85). Estos hechos, junto con la existencia de microorganismos que requieren Hemo como factor de crecimiento, que no pudo reemplazarse por Fe^{++} y Proto IX al medio de cultivo (86), llevaron a la conclusión de que la formación de Hemo a partir de Proto IX, "in vivo" era un proceso enzimático, en desacuerdo con suposiciones para las cuales se producía sin intervención de ninguna enzima (38). Dailey y col. (87) describieron una mutante de *Spirillum itersonii* la cual carece de la actividad de ferroquelatasa y requiere por lo tanto de hemo exógeno para su crecimiento. Esto provee evidencias directas de que la inserción de Fe^{++} a la Proto IX es un proceso enzimático. Porra en 1963 (86) demostró que los porfirinógenos no son sustratos de la enzima, resultados ya mencionados por experiencias anteriores (88).

Se vió que la enzima de todos los sistemas estudiados, es sensible al aire, lo cual se soluciona por el agregado de agentes reductores de grupos -SH. Estos son necesarios también para mantener reducido el ión ferroso, que de lo contrario sería oxidado por el aire (86).

La enzima es particulada; y fué hallada en las mitocondrias de distintos tipos de células (89-92). Se estudió la especificidad de la enzima respecto a los sustratos y se vió que era activa con Proto IX, Hematoporfirina, Deuteroporfirina y Mesoporfirina produciendo los respectivos complejos "hierro porfirina" (89).

II. PORFIRIAS HUMANAS.

Las porfirias son desórdenes metabólicos, la mayoría de naturaleza hereditaria, caracterizados por una formación incrementada de porfirinas y/o precursores las cuales se acumulan en gran exceso dentro del cuerpo (93).

Las porfirinas son sintetizadas en todos los tejidos del cuerpo, debido a que el hemo es una parte no solo de las moléculas de hemoglobina y mioglobina, sino también de citocromos y enzimas hémicas como peroxidásas y catalasa. Los desórdenes en el metabolismo de porfirinas en el hígado y en la médula, son principalmente los causantes de los trastornos clínicos. Las porfirias pueden por lo tanto dividirse en 2 grandes categorías: hepáticas y eritropoiéticas dependiendo del sitio del tejido donde

se encuentra el error metabólico.

Las porfirias pueden clasificarse de la siguiente manera (75, 94)

1.- Porfiria hepática.

- i) Porfiria aguda intermitente.
- ii) Porfiria variegata: porfiria mixta, porfiria genética de Sud Africa, porfiria cutánea tarda hereditaria o proto-coproporfiria.
- iii) Coproporfiria hereditaria,
- iv) Porfirias sintomáticas: porfiria cutánea tarda sintomática (PCT) urocoproporfiria.
 - a) idiosincrática: asociada con alcoholismo, trastornos hepáticos, drogas,
 - b) adquirida: porfiria inducida por HCB u otros agentes tóxicos.
 - c) porfirinoma: porfirinas producidas por un adenoma hepático.

2.- Porfiria eritropoiética.

- i) Porfiria eritropoiética congénita,
- ii) Protoporfiria eritropoiética.

El mayor síntoma clínico de la PCT es la fotosensibilidad cutánea y la orina roja excretada durante la fase activa de este desorden metabólico. La característica química de esta enfermedad es un incremento de la excreción de porfirinas (uro-, hepta-, hexa-, penta- y coproporfirina). Muchos pacientes poseen una lesión hepática y a menudo cirrosis alcohólica y frecuentemente los niveles de hierro están elevados.

El desarrollo de la PCT en humanos involucra varios estudios clíni-

nicos con signos bioquímicos típicos, que Doss y col. (94) clasificaron como porfiria crónica hepática.

Los varios tipos de porfirias crónicas hepáticas en humanos son la expresión de diferentes grados de deficiencia de Uro-D (95, 96), esta disminución de Uro-D es también causada por HCB en ratas.

III. HEXACLOROBENCENO Y SU RELACION CON PORFIRIA.

III.1. Contaminación con HCB.

La presencia en tejido adiposo humano de residuos de pesticidas clorados resulta frecuentemente del consumo de alimentos contaminados, tratados intencionalmente con productos químicos para el control de organismos perjudiciales o incidentalmente con contaminantes ambientales o de procedencia industrial.

El HCB es un reemplazante de los fungicidas mercuriales y un coproducto en los procesos de clorinación industrial. Aparece como contaminante de pescados, aves silvestres, productos para corrales, leche, derivados de la leche, leche humana y tejido adiposo (97).

III.2. Metabolización del HCB.

III.2.a. Excreción y acumulación de metabolitos del HCB.

En 1960 Parke y Williams (98) comunicaron sobre el destino

metabólico del HCB en conejos. En este caso la sustancia se administró oralmente como suspensión acuosa o subcutáneamente como solución en aceite. No se encontraron metabolitos en heces y orina. Lui y col. (99) y Mehendale y col. (100) comunicaron sobre el metabolismo del HCB en ratas hembras. Los primeros determinaron que el pentaclorofenol (PCF) es un metabolito urinario del HCB. En este estudio no caracterizan otros metabolitos y no examinan materia fecal.

Mehendale y col. (100) determinaron al pentaclorobenceno (PCB) , tetraclorobenceno (TCB) y PCF como metabolitos urinarios; después de la administración de HCB por períodos cortos a ratas. No detectan metabolitos en heces. A diferencia de lo informado por estos autores Kószó y col. (101) detectan sólo PCF y HCB en orina y heces, siendo la relación entre PCF y HCB mayor en orina que en heces. Koss y col. (102) identifican junto con PCF y tetraclorohidroquinona (TCH), pentaclorotiofenol (PCTF) como metabolitos del HCB en orina y un isómero del tetraclorotiofenol (TCTF) como un metabolito en menor cantidad que los anteriores.

En heces se identificó sólo PCF y PCTF . Después de administrar ^{14}C -HCB (102, 103) en forma intraperitoneal a ratas hembras en dosis de 260 y 390 mg/kg (cantidades totales que se administró a cada animal) se analizó la radioactividad excretada en orina y heces. En orina se encontró que más del 90% de ^{14}C excretado se halla marcando los metabolitos identificados.

En heces sólo el 25% del ^{14}C excretado se encuentra marcando los metabolitos fecales y por lo tanto la mayor cantidad de ^{14}C detectado por esta vía se encuentra marcando la droga sin transformarse (102, 103).

La proporción de los metabolitos fenólicos (102) (PCF y TCH; Fig.15) a los metabolitos azufrados (PCTF y TCTF ; Fig.15) excretados es mayor que 1. En tejidos de animales sólo el PCF(102) se detecta como metabolito del HCB en cantidades medibles, después de administrar HCB a ratas. En el curso de intoxicación crónica con esta droga, (101) hay acumulación de la misma en hígado y en tejido adiposo.

III.2.b. Formación de intermediarios reactivos y metabolitos que contienen azufre.

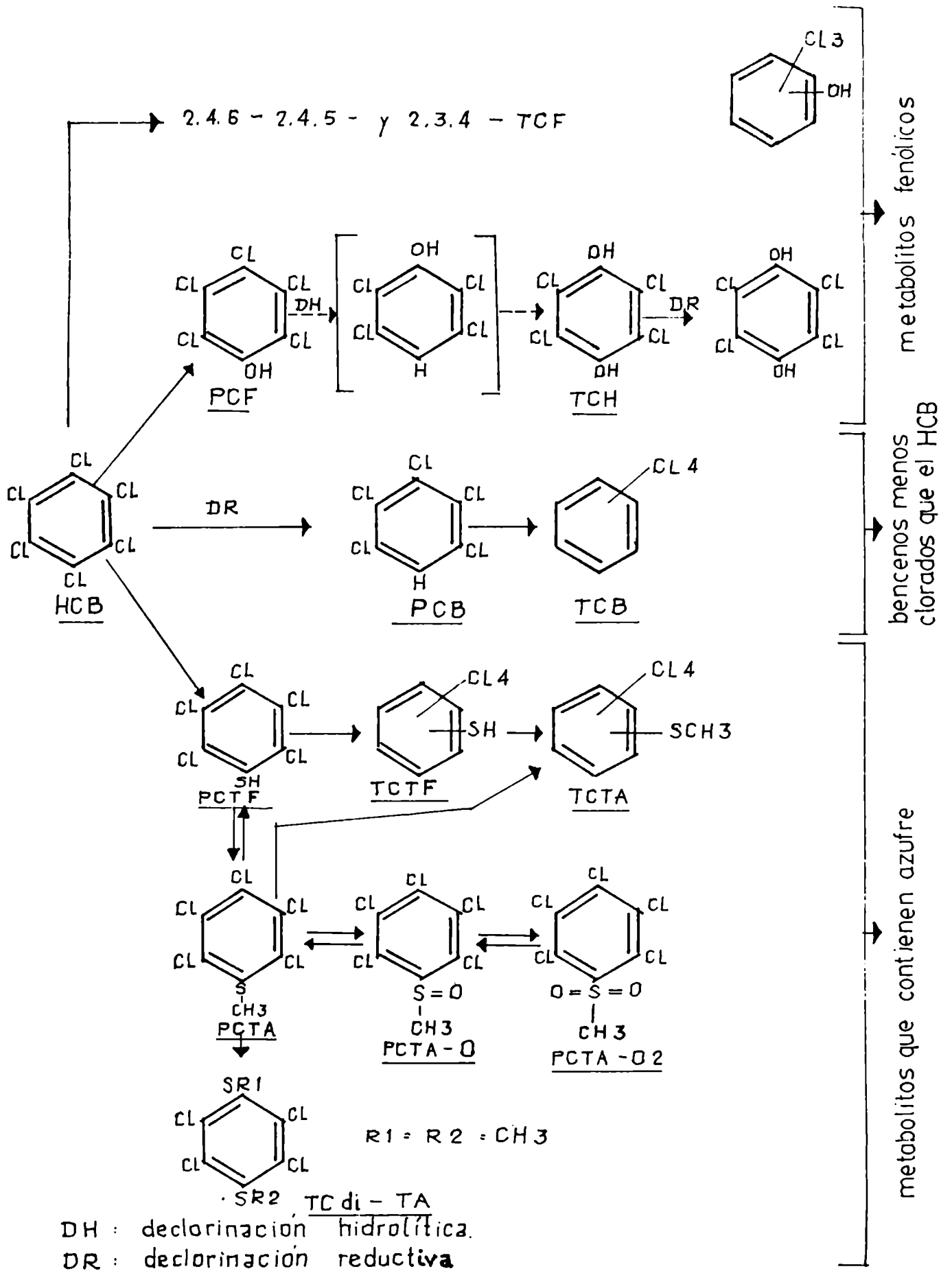
Los compuestos aromáticos polihalogenados pueden transformarse en metabolitos que contienen azufre.

Se han encontrado como metabolitos azufrados (102, 104), en la excreta de ratas PCTF, pentaclorotioanisol (PCTA), TCTF, tetraclorotioanisol (TCTA) y tetracloroditioanisol (TCdi-TA) (Fig.15). Después de cortos tiempos de administración de HCB el PCTF representa alrededor de 1/3 de la cantidad total de metabolitos excretados (102).

La mayor parte de los tiofenoles pueden ser aislados de la excreta sólo después de hidrólisis alcalina. Los metabolitos que contienen azufre pueden en parte derivar de conjugación con

Fig. 15

DESTINO METABOLICO DEL HCB EN RATAS.



GSH, de una reacción con metionina (104), o por unión covalente de intermediarios reactivos a grupos funcionales de enzimas.

Para investigar el rol que juegan los metabolitos que contienen azufre en la producción de porfiria se ensayó en ratas, el efecto del Hg (105) el cual tiene alta afinidad por los grupos sulfhidrilos. Se administró, a los animales, HCB y Cl_2Hg y ambos compuestos por separado. Se observó un incremento más temprano de las porfirinas totales del hígado en los animales que reciben ambas drogas al mismo tiempo que en los tratados con HCB o Cl_2Hg por separado. Estos experimentos indican de que la administración adicional de Hg al drogar a los animales con HCB lleva a un decremento más temprano de la actividad de la enzima Uro-D comparado con la actividad de la misma cuando se administran ambos compuestos por separado. Por lo tanto, la reactividad esperada de los metabolitos del HCB con grupos sulfhidrilos, sugerirían que los disturbios producidos en el metabolismo de porfirinas, no son sólo por reacción con GSH sino también por reacción con grupos sulfhidrilos de proteínas, incluyendo las que son enzimáticamente activas.

El significado biológico y toxicológico de metabolitos que contiene azufre, provenientes de hidrocarburos aromáticos halogenados, en relación a porfiria hepática es todavía desconocido. En este sentido se investigó la acción del PCTF y se encontró que este metabolito es capaz de producir disturbios en el metaboli-

mo hepático de porfirinas en presencia de niveles elevados de ALA (106).

III.3. Acción del HCB sobre el camino metabólico del Hemo.

III.3.a. Producción de porfiria por HCB.

En 1956 aparecieron miles de casos de porfiria humana en el sudeste de Turquía con los rasgos clínicos y químicos de una PCT (107, 108). Se demostró subsiguientemente que se trataba de una porfiria adquirida y que ese brote masivo (aproximadamente 3.000 casos) estaba relacionado con el consumo de productos fabricados con semillas de trigo tratadas con HCB,

La confirmación de los efectos tóxicos de esta droga se obtuvo a consecuencia de los trabajos realizados por Ockner y Schmid (109) quienes fueron los primeros en producir porfiria experimental en ratas al administrar HCB. Trabajos posteriores demostraron que esta droga produce también porfiria hepática en conejos, cobayos (110) cultivo de células hepáticas de embrión de pollo (111) y que tiene efectos tóxicos sobre pájaros silvestres (112) siendo estos últimos mucho más susceptibles que las ratas a dicho agente,

La porfiria producida en ratas por HCB está caracterizada por un síndrome cutáneo (10) una muy elevada excreción de porfirinas (110, 113) acompañada por una excreción menor de precursores, (113) por una acumulación de porfirinas en hígado

(109, 110, 113, 114) y en riñón (114) y a diferencia de lo que ocurre en humanos, por aparición de síntomas neurológicos (110, 114). El estudio químico de las porfirinas urinarias (113) ha demostrado que se excretan porfirinas de 4-, 5-, 6-, 7- y 8-COOH pertenecientes esencialmente al tipo isomérico III con un notable predominio de la última (Uro) que constituye un 50% de las porfirinas excretadas.

El hígado es el órgano principalmente afectado en el cual se ha encontrado una gran acumulación de Uro III (8-COOH) y Firia (7-COOH) (69, 113, 115). Se observó también acumulación de porfirinas en riñón y bazo, siendo éstas, al igual que en hígado, Uro III y Firia. En el tejido eritropoietico se determinó cantidades normales de porfirinas acumuladas en las ratas intoxicadas con HCB (69, 115) y en la glándula de Harder un decremento de porfirinas (69, 115) en las mismas.

La administración de HCB a ratas por un período mayor que 67 días produce un desarrollo de grandes vacuolas citoplasmáticas y la formación de inclusiones citoplasmáticas (116). Algunas de las inclusiones consisten en delgadas estructuras tubulares de alrededor de 200 \AA de diámetro. La naturaleza de las inclusiones no está claramente determinada pero se sospecha que pueden representar porfirinas. Se sabe también que las células del hígado exhiben una fluorescencia roja cuando se exponen a la luz ultravioleta, indicando la presencia de porfirinas.

Se encontró una correlación (117) entre los niveles de porfirinas (Uro, Firia, Hexa y Penta) excretados en orina y heces y la actividad de la enzima Uro-D en riñón y colon de rata. En los ataques agudos de porfiria humana y de porfiria inducida por drogas en ratas, se observa un gran incremento de porfirinas y precursores en orina. Los resultados de Day y col. (117) en experimentos intoxicando ratas con HCB y fenilbutazona, parecerían indicar que la mayoría de este exceso de precursores hémicos son sintetizados en el tejido renal y no en el hepático.

III.3.b. Acción del HCB sobre la actividad de ALA-S.

Se observó que después de 72 hs. de una dieta conteniendo 0.2% de HCB a ratas hembras no se detectan variaciones en la actividad de ALA-S, cuando hay en cambio un incremento en la cantidad de citocromo P-450 (118). Cuando se detectan manifestaciones de porfiria la actividad de esta enzima aumenta⁽¹¹⁹⁾, Wada y col. (120) detectaron un incremento de la actividad de ALA-S, al alimentar a ratones durante 24 hs. con una dieta de HCB (2.5% p/p).

En este último caso se observa un aumento de citocromo P-450 y manifestaciones de porfiria dentro de dichas 24 hs.

III.3.c. Acción del HCB sobre la actividad de ALA-D, PBG-asa y Copro-D.

La actividad de ALA-D en ratas hembras alimentadas con HCB disminuye con tratamiento prolongado de la droga (118). Estos resultados difieren con los de San Martín de Viale y col. (119) don-

de se encuentra un aumento en la actividad de dicha enzima con el mismo tipo de intoxicación.

La actividad de PBGasa muestra un incremento aún mayor que ALA-S y ALA-D en los animales intoxicados respecto a los normales (119).

La actividad de Copro D (121) es la misma en ratas normales y en ratas intoxicadas con HCB. Estos resultados estarían de acuerdo con el hecho de que ratas intoxicadas con HCB excretan isocopro-porfirina (Fig. 13) y pentaporfirina en cantidades mayores (121)

III.3.d. Acción del HCB sobre la actividad de Uro-D.

Se realizaron estudios para determinar la cantidad de porfirinas acumuladas en hígados normales y en hígados de ratas tratadas con HCB. Se observó (115) que en hígados normales la pequeña cantidad de porfirinas totales presentes está constituida por Copro (4-COOH) y Proto (2-COOH) mientras que en hígado porfírico, la gran cantidad de porfirinas acumuladas, tanto en sobrenadantes como en homogenato total, está constituida por porfirinas altamente carboxiladas: Uro (8-COOH) y Firia (7-COOH) con un gran predominio de la primera (70 - 75%). Esta gran acumulación de Uro y Firia sugería un probable defecto en la Uro-D,

Se determinó que la intoxicación por HCB produce una marcada disminución de la actividad de esta enzima, que afecta ambas etapas de decarboxilación. La 1a, etapa que lleva de Uro a Firia

se ve afectada en menor grado que las descarboxilaciones que llevan al producto final. Cuando las determinaciones se hacen empleando cantidades semejantes de enzima, en ambos casos normales y porfíricos, las disminuciones son del orden del 76% para la 1a. etapa y del 100% para la formación del producto final (115).

El bazo porfírico de ratas intoxicadas con HCB acumula porfirinas en mucho menor cantidad que el hígado. Se observa que el HCB produce un muy ligero aumento en la actividad de Uro-D en el bazo porfírico respecto al normal, en ambas etapas de descarboxilación del Uro'gen III.

La droga en estudio no tiene prácticamente influencia sobre el contenido de porfirinas en glóbulos rojos de ratas. En cuanto a la naturaleza de las porfirinas se observó que tanto en los animales tratados como en los no tratados hay sólo presencia de trazas de Copro y Proto. Al determinarse actividad de Uro-D se observó que la droga no tiene efecto sobre la enzima de este tejido en ninguna de las 2 etapas medidas (69). En este tipo de porfiria experimental se observa también un aumento de porfirinas en riñón con acumulación de porfirinas de 8 y 7-COOH y una disminución de la actividad de la Uro-D (115). Blekkenhorst y col. (122) encontraron también decremento en la actividad de Uro-D en hígado y riñón después del tratamiento de ratas por 50 días con HCB.

Describieron el efecto del HCB sobre la Uro-D del colon y determinaron que el efecto de la droga es disminuir también

la actividad en este órgano. Durante los primeros estadios de intoxicación con HCB los animales pasan por una fase transitoria diferente de la fase posterior semejante a una PCT (122);

El decremento de la Uro-D en porfiria experimental por HCB fué descrito también por Elder y col (123) y por Taljaard y col. (124). El primero (123) determina la actividad enzimática utilizando penta-porfirinógeno (Penta'gen) como sustrato. El segundo (124-125) utiliza Uro'gen como sustrato; encontrando decremento de actividad de Uro-D sólo en el caso de ratas sideróticas intoxicadas con HCB.

IV, PROPIEDADES DEL PENTAFLOROFENOL (PCF).

IV.1. Propiedades físicas del PCF.

El PCF se prepara por clorinación del fenol en presencia de un catalizador (126). Su PM es 266.35. Forma agujas parecido a cristales; su polvo produce estornudo; produce un olor muy picante cuando se calienta. Sublima en forma de agujas. Su densidad es 1,978. Punto de fusión 190 - 191°C. Punto de ebullición 309 - 310°C con descomposición. Casi insoluble en agua (8 mg en 100 ml), Francamente soluble en alcohol y eter, soluble en benceno; poco soluble en eter de petroleo frío. Forma sales de sodio. Se usa en la preservación de madera, productos derivados de la madera, almidón, dextrinas, vidrios, etc.

IV.2. Intoxicaciones con PCF.

El PCF es un potente desacoplante de la fosforilación mitocondrial y también interfiere con las funciones de detoxificación microsomal. Esto lleva a un disturbio fisiológico general asociado con disturbios en la utilización de la energía (127). La exposición humana ocurre frecuentemente en granjeros, comerciantes que preservan la madera, y trabajadores industriales que manejan este producto químico. Hay varios informes de intoxicación en la literatura (128, 129).

Uno de ellos ocurrió en la nursery de St. Louis donde se intoxicaron 20 niños con pañales impregnados con PCF, de los cuales 2 murieron. El PCF se usaba en el detergente de lavado para prevenir moho (128). Se informan casos de intoxicación industrial con esta droga (130) donde 10 a 17 trabajadores involucrados en la producción de PCF mostraron severas erupciones de piel y furunculosis. Se observaron signos de acné 1 año después de dejar de trabajar en la producción. Se observó también intoxicación en peces y en gatos (131-133).

IV.3. Metabolismo del PCF.

Se estudió la excreción de PCF-¹⁴C en orina de ratas y ratones después de la administración oral e intraperitoneal del compuesto radioactivo (10 a 25 mg/kg.) (134). Se encontró que el 41 al 43% de la radioactividad excretada estaba presente como PCF. Por espectrofotometría de masa se identificó un metabolito como

TCH, que representa el 5 y 24% de la radioactividad excretada en ratas y ratones, respectivamente. No se pudo, demostrar por hidrólisis enzimática conjugación con ácido glucurónico. Calentando la orina con ácido clorhídrico se vió que toda la radioactividad excretada aparecía marcando al PCF y TCH. De esta forma se hidroliza el compuesto conjugado formado por PCF y TCH y se pueden cuantificar ambos.

Jakobson y col. (135) inyectaron también ^{14}C PCF a ratones seguido de rápida absorción y excreción de la radioactividad. Alrededor de 1/3 de la cantidad inyectada se excreta en forma de PCF tal cual en orina. Parte de PCF se encuentra en la forma conjugada. No se investigó la naturaleza de esta forma conjugada. En conejos (136) se excreta por orina alrededor del 70% de PCF. La mayor cantidad del PCF acumulado en tejidos se localiza en el estómago e intestinos, músculo y sangre; cantidades menores se localizan en otros órganos como hígado.

Deichman y col. (137) encuentran también una excreción por orina de un 70% de PCF después de administración oral de pentaclorofenato de sodio a conejos, y una muy pequeña excreción en heces. En ratas encuentran que sólo el 13% de la cantidad administrada es excretada. Indican que el PCF no es detoxificado por conjugación con ácido sulfúrico o glucurónico (137) lo cual estaría de acuerdo con lo informado por Betts y col. (136).

V. FENOBARBITAL Y SU RELACION CON EL CAMINO METABOLICO
DEL HEMO.

Una gran variedad de drogas y productos químicos como barbituratos e hidrocarburos clorinados incrementan la actividad del sistema enzimático microsomal hepático metabolizante de drogas. El fenobarbital (FB) es usado como prototipo de los compuestos conocidos que estimulan el metabolismo de drogas (138).

El citocromo P-450 y el b_5 participan marcadamente en el incremento del metabolismo de drogas (139, 140). El FB incrementa el contenido de citocromo P-450, es un inductor débil de ALA-S y causa efectos anabólicos como proliferación del retículo endoplasmático, incremento de la síntesis de proteínas y lípidos, incremento del contenido de RNA y estabilización de los poliribosomas (141).

El tratamiento previo con FB (80 mg/kg.) administrado en forma subcutánea por 5 días, o solución salina, para Kaufman y col (138) no afecta significativamente los niveles hepáticos de la ALA-S. Wada y col. (120) observan que en ratones, la actividad de ALA-S llega a 1.5-2 veces el valor normal, después de 48hs., inyectando FB cada 12hs. Tephly y col. (142) determinan el máximo incremento de ALA-S después de 12 hs. de una única inyección de FB. Después de esta máxima estimulación, la actividad de ALA-S hepática disminuye lo cual no se puede prevenir con repetida administración de FB o incrementando la dosis (142).

Padmanaban y col. (143) observan que el FB induce la enzima ALA-S

2.5 veces en ratas ayunadas y que la actividad tiene un máximo alrededor de las 6 - 8 hs.

Meyer y col. (144) explican que debido al limitado incremento de ALA-S en los animales drogados con FB, estos no exhiben prolongados incrementos en la excreción urinaria de ALA, PBG y porfirinas, lo cual es característico de la porfiria hepática (120, 144). Tephly y col. encuentran que la cantidad de citocromo P-450, en animales tratados con FB, incrementa después de 8 hs de la inyección de esta droga; llegando a un máximo a las 96 hs y decreciendo entre las 96 y 120 hs (142).

Padmanaban y col. (143) no encuentran evidencias de decrecimiento en el citocromo P-450.

La N dimetilasa (120) una de las enzimas que interviene en la metabolización de drogas se induce en forma semejante al aumento de la concentración de citocromo P-450.

Por tratamiento prolongado con FB se incrementa la actividad de ferroquelatasa (142, 145). Wada y col. (120) miden la incorporación de ^{14}C - glicina en el hemo "in vivo" en ratones. Observan que la cantidad de radioactividad incorporada incrementa después de comenzar a drogar con FB ocurriendo la estimulación máxima aproximadamente a las 48 hs.

VI. HIERRO Y SU RELACION CON PORFIRIA.

VI.1. Rol del hierro en PCT y su relación con porfiria experimental producida por HCB.

La porfiria humana y experimental están caracterizadas por

una sobreproducción de porfirinas y precursores en el hígado, en cantidades que exceden las normalmente requeridas para la formación de las varias hemoproteínas hepáticas.

Tanto la porfiria experimental como la humana tiene un cuadro de excreción de precursores y porfirinas características pudiéndose por lo tanto comparar los distintos tipos de porfiria humana con los distintos tipos de porfiria experimental, Así 3,5-dietoxicarbonil-1,4 dihidrocolidina (DDC) produce un cuadro bioquímico similar a la porfiria hepática aguda humana del tipo "variegata"; el HCB induce una porfiria del tipo cutánea tarda humana.

Hay evidencias de que la administración de hierro puede agravar la porfiria crónica hepática no sólo en humanos sino también en animales de experimentación,

La disminución del contenido de hierro en personas con porfiria cutánea tarda por repetidas flebotomías puede mejorar el estado de porfiria, a menos que al mismo tiempo se de un exceso de hierro. La administración de hierro a pacientes en remisión produce una reexacerbación del estado de porfiria,

Similarmente en animales de experimentación la sobrecarga de hierro aceleran el desarrollo e incrementan marcadamente la porfiria producida por HCB. Por lo tanto la porfiria inducida por HCB sirve como modelo para el estudio de la PCT no sólo desde el punto de vista del cuadro bioquímico sino también de su sensi-

bilidad a la administración de hierro exógeno (146).

VI.2. Ro1 del hierro en la exacerbación de la PCT.

En PCT se postula fundamentalmente una disposición genética, involucrando posiblemente un defecto en la enzima Uro-D (147). El camino por el cual el daño hepático, el alto consumo de alcohol y los desórdenes en el metabolismo del Fe interactúan con este factor genético no está claro. Se obtuvieron evidencias indirectas del rol del Fe en la producción de los desórdenes metabólicos (148). Se sugirió (148) que el hierro está específicamente involucrado en el metabolismo de compuestos clorinados o sus derivados, los cuales pueden inhibir la Uro-D. Es también probable que el hierro esté directamente involucrado en la patogénesis de la PCT.

El hierro podría afectar la actividad de distintas enzimas del camino metabólico del hemo.

VI.2.a. Efecto del hierro sobre la acumulación de porfirinas y la actividad de ALA-S.

El hierro puede incrementar la acumulación de porfirinas (149, 150), siendo estimulada la síntesis de las mismas por el ión ferroso (150) produciéndose principalmente Uro'gen I.

Stein y col. (149) informan que la sobrecarga de hierro estimula la ALA-S del hígado, y que la acumulación de porfirinas depende por lo tanto del balance entre la producción de porfi-

rinas y la conversión de las mismas a hemo.

VI.2.b. Efecto del hierro sobre la actividad de Uro-CoS.

Se investigó el efecto del ión ferroso sobre la enzima Uro-CoS (150) incubando extractos crudos de hígado con sulfato de hierro y amonio y cistefna. Se observó que tanto en humanos como en porcinos el ión ferroso causa marcada inhibición de la enzima Uro-CoS.

VI.2.c. Efecto del hierro sobre la Uro-D.

Se informó (151) que la Uro-D de hígado porcino descarboxila la Uro I y Uro III a la misma velocidad; y la adición de hierro produce una marcada inhibición de dicha actividad enzimática.

El hierro divalente es tóxico (146) y podría intervenir en los procesos oxidativos, produciendo daño en membranas celulares del hígado y en ciertas enzimas sulfhidríficas como ALA-D y Uro-D. El hierro trivalente no es tóxico (146).

Elder y col. (96) investigaron la actividad de Uro-D en hígado de 7 pacientes hombres y en 12 controles utilizando Penta' gen como sustrato de la enzima. Determinaron que la actividad de Uro-D estaba disminuída en los pacientes con PCT respecto a los controles normales.

La actividad de Uro-D (96) permanece igualmente disminuída ya sea que los pacientes se hallen con importantes lesiones de

piel o que estén en estado de remisión. La concentración de hierro, (96) en cambio, es más baja cuando los pacientes están en remisión. Kushner y col, (95) informaron que la actividad de Uro-D de hígado en pacientes con PCT no varía después de tratamiento con repetidas flebotomías.

Estos resultados (95, 96) sugerirían que las variaciones en las concentraciones de hierro hepático no tienen efecto sobre la actividad de la Uro-D.

La actividad de esta enzima en eritrocitos y fibroblastos es la misma en sujetos normales y en pacientes con PCT (96).

VI.3. Efecto de la sobrecarga de hierro en porfiria experimental por HCB.

El efecto del HCB fué estudiado en animales sideróticos por tratamiento, intraperitoneal con hierro-dextrano y en no sideróticos. En el grupo de ratas no sideróticas alimentadas con HCB hay un progresivo decremento en la actividad de Uro-D acompañada por un progresivo incremento en la actividad de ALA-S. Las concentraciones de citocromo P-450 aumentan durante el experimento pero decaen al final del mismo (152). Cambios similares pero más marcados se producen en animales sideróticos. El decremento de la actividad de Uro-D en estos animales ocurre más tempranamente y es mayor (122) y el incremento de ALA-S es consistentemente mayor. La siderosis hepática tiene un efecto sinérgico con HCB sobre la Uro-D hepática y puede promover efectos adicionales promoviendo el turnover

de citocromo P-450 (152). Las ratas previamente sideróticas por administración intraperitoneal de hierro-dextrano adquieren porfiria mucho más rápidamente que los animales no sideróticos, cuando se alimentan con HCB (153). Un incremento significativo de la actividad de ALA-S se demuestra sólo en el grupo siderótico en la primer parte del experimento pero luego todos los grupos manifiestan un incremento de la actividad de esta enzima.

Taljaard y col. (153) determinaron actividad normal de Uro-D en ratas no sideróticas alimentadas con HCB, mientras que San Martín de Viale y col. (115) encuentran disminuída la actividad de esta enzima en ratas no sideróticas. La siderosis sola no tiene efecto sobre la Uro-D (125). La sobrecarga de hierro y el HCB tienen un efecto sinérgico sobre esta enzima (125-154) encontrándose un mayor decremento de Uro-D en los animales que reciben los 2 compuestos al mismo tiempo que en los que reciben HCB sólo.

VI.4. Efecto del HCB en animales con distintos niveles de hierro.

Se trabajó con ratas Agus y Porton Wistar (154). El contenido en Fe no hémico en el hígado de las primeras es mayor que en las segundas. Se encontró que existe una diferencia significativa entre las 2 cepas de ratas en cuanto a su respuesta al efecto porfirinogénico del HCB. Después de 112 días de tratamiento la cepa Agus muestra un incremento en las porfirinas hepáticas de 1.800

veces mientras que en las Porton el incremento es de solo 9 veces. Estas diferencias entre las 2 cepas puede correlacionarse con diferencias en las actividades de 2 enzimas llaves del camino metabólico del hemo: Uro-D y ALA-S (154).

VI.5. Deficiencia en hierro por quelantes.

La desferrioxamina (DF) fué ampliamente usada clínicamente en el tratamiento de pacientes con porfiria por exceso de hierro. La DF, un quelante de hierro inhibe la actividad de la ferroquelatasa mitocondrial y estimula la actividad de hemo oxigenasa microsomal (Hemo - O) en hígado de ratas. La enzima Hemo-O libera al hierro del hemo y lo degrada a biliverdina y monóxido de carbono.

El efecto inhibitorio sobre la ferroquelatasa no está acompañada por un incremento en la actividad de ALA-S (155). La ausencia de la inducción de ALA-S después del tratamiento de las ratas con DF indican de que el hierro debe ser requerido para la expresión de la actividad de ALA-S (156). El incremento de los niveles de porfirinas que ocurre en el hígado después de la administración de DF indican que este compuesto causa también un decremento en el hierro disponible para la síntesis de hemo (156).

VI.6. Deficiencia en hierro por bajos niveles en la dieta.

Experimentos realizados en ratas, muestran que la deficiencia en hierro incrementa la velocidad del metabolismo hepático de dro-

gas tanto "in vivo" como "in vitro" (157). Los niveles de ALA-S decrecen progresivamente en ratas alimentadas con baja dieta de hierro durante 10 a 30 días. Esto sugiere que el hierro tiene un rol regulatorio directo en la síntesis de ALA. En el procedimiento experimental usado para determinar la actividad de ALA-S, uno de los sustratos es Succinil CoA el cual se genera en la mitocondria a partir de Succinato, CoA y ATP. No se puede distinguir por lo tanto si el efecto del hierro es directamente sobre la ALA-S o sobre la enzima precedente, Succinil CoA Sintetasa (156).

Se realizaron experimentos para determinar si la deficiencia en hierro puede proteger a los ratones del desarrollo de porfiria durante la exposición a TCDD. Se encontró que dicha deficiencia previene la enfermedad, no detectándose decremento de la actividad de la enzima Uro-D, lesiones en piel ni en hígado en los animales con dietas deficientes en Fe y tratados con TCDD. El incremento en porfirinas urinarias ocurre sólo en los ratones tratados con la droga y con dieta normal en hierro. En los que consumen una dieta deficiente en el metal no se observa dicho incremento (158). Esto demuestra: a) un efecto sinérgico entre la concentración normal de hierro en la dieta de laboratorio y la droga específica TCDD y b) que el efecto tóxico del TCDD no se debe solo a esta droga (158).

OBJETO DEL TRABAJO.

El interés de los estudios con HCB en ratas radica en que la porfiria desarrollada en estos animales sirve de modelo experimental para el estudio de la PCT humana y de las porfirias producidas por otros hidrocarburos clorados como los bifenilos policlorados y las clorodioxinas.

El presente trabajo tiene por objetivos mayores:

- 1.- Elucidar si el HCB produce la porfiria "per se" o a través de un metabolito.
- 2.- Investigar si el HCB o el metabolito ejercen su acción sobre las actividades de las enzimas del hemo (ALA-S, ALA-D, PBG-asa y Uro-D) o si mas bien afectarían la síntesis de dichas proteínas.
- 3.- Evaluar si el PCF es o no uno de los metabolitos a través del cual el HCB ejerce sus efectos porfirinogénicos.
- 4.- Aportar datos tendientes a elucidar el papel del hierro en la producción de esta porfiria,

Los objetivos analíticos son:

- 1.a.- Localizar los puntos de acción de la droga a lo largo de la cadena metabólica del hemo, específicamente en lo que concierne a la primera enzima (ALA-S), a la segunda (ALA-D) y a la que decarboxila porfirinas (Uro-D), Esto a los fines de ver en función del tiempo de intoxicación cuál es la primera que se afecta y cuál lo hace en mayor grado integrando estos resultados con los obtenidos para PBG-asa y citocromo P-450.

- 1.b.- Determinar qué efectos tiene el FB sobre los distintos parámetros del metabolismo del hemo y su influencia sobre los efectos producidos por el HCB en esta biosíntesis.
- 2.a.- Establecer si en las preparaciones de hígados porfíricos está presente algún inhibidor o activador de las enzimas en estudio.
- 3.a.- Determinar la acción del PCF "in vitro" sobre la actividad de ALA-S, ALA-D, PBG-asa y Uro-D.
- 3.b.- Probar la capacidad porfirinogénica del PCF "in vivo".
- 4.a.- Elucidar químicamente si en esta porfiria experimental está alterado el contenido de hierro total.
- 4.b.- Determinar qué tipo de hierro está alterado (hémico, no hémico).
- 4.c.- Determinar qué relación podrían tener estas alteraciones con la disminución de la Uro-D y con los aumentos de ALA-S, ALA-D y PBG-asa hepáticas observada en ratas tratadas con la droga.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES.

Sustratos.

ALA; procedente de Sigma Chemical Co (U.S.A.).

Uro III: se aisló de turacina como se describe en Métodos.

PBG: procedente de Sigma Chemical CO (U.S.A.).

Glicina: Merck.

Solventes.

Cloroformo: Se utilizó C.Erba FU para realizar las esterificaciones de las porfirinas libres.

Se utilizó C.Erba RP para eluir las cromatografías,

Metanol: C.Erba FU.

Acetato de etilo: p.a. Atanor.

Acido acético glacial: p.a. Atanor.

Kerosene: incoloro, usado en cromatografía, fué la fracción 190°-240°. Se obtuvo a partir del kerosene comercial el que fué lavado con agua varias veces, secado 48hs. sobre Cl_2Ca y destilado con columna rectificadora. Se hacía una primera destilación entre 180-250°; dicha fracción volvía a destilarse, recogiendo el rango arriba indicado.

Dioxano: Lowens para cromatografía.

Benceno: p.a. Sintorgan.

Otras drogas.

HCB: Se usó la droga de grado técnico suministrada por Cía. Química S.A. para la administración a ratas.

HCB: Fisher, para los ensayos "in vitro".

PCF: Se usó la droga en dos formas: a) de grado técnico, cedida gentilmente por Monsanto Chemical Co. y por Compañía Química S.A. b) purificada.

Para purificar la droga se partió de PCF técnico 60% cuya composición era Tetraclorofenol 40-50%, Pentaclorofenol 50-60%. Se realizaron 5 recristalizaciones de benceno caliente y se obtuvo un precipitado blanco cuyo punto de fusión era muy cercano al teórico de 188-189°C. El método de purificación por sublimación no es recomendable en este caso, pues lo que sublima a aprox. 150°C es el tetraclorofenol; el PCF que tiene un punto de ebullición de 309°C queda en el balón junto con todas las impurezas de naturaleza alquitranosa.

FB sódico: fué gentilmente cedido por laboratorios Bayer.

Resina Dowex A.G.1-X₈, mesh 100-200: forma cloruro o acetato.

Resina Dowex A.G.50-X₈, mesh 100-200: forma ión hidrógeno. Estos dos tipos de resina son fabricadas y distribuidas por Bio Rad Laboratories, en Richmond, California.

Sephadex G-25: Proveniente de Pharmacia.

Sondas para drogado de ratas: Franklin Nelaton.

Animales: Para los estudios con HCB se usaron ratas Wistar hembras de 160-200 g de peso. En los estudios con PCF se usaron ratas Wistar y embriones de pollo de la cepa White Leghorn.

METODOS

I. INDUCCION DE PORFIRIA EN ANIMALES MEDIANTE ADMINISTRACION DE HEXACLOROBENCENO Y PENTA- CLOROFENOL.

I.1. En ratas.

Ratas blancas hembras, Cepa Wistar cuyo peso oscila entre 170 y 200 g se mantienen durante todo el estudio en jaulas metabólicas. Estas últimas contienen embudos de plástico y ojivas de vidrio tendientes a la no contaminación de las orinas con heces. A dichos animales se les suministra siempre una dieta completa standard "Purina" dieta 3 y agua "ad libitum".

La porfiria se induce experimentalmente en ellas por administración de a) HCB b) FB + HCB y c) PCF.

I.1.a. El HCB se suspende en agua con ayuda de Tween 20, de modo que la concentración final de HCB es de 40 mg/ml. Para suspenderlo, sobre el HCB sólido colocado en un mortero, se agrega el Tween 20 (0.5 ml por cada 100 ml de agua a agregar), se mezcla íntimamente la droga con el agente tensioactivo y luego se le agrega de a poco y agitando el agua, de modo de producir una buena sus-

pensión. El HCB así preparado se administra diariamente a los animales por sonda gástrica en dosis de 1 g/kg de peso de animal.

El estado de porfiria en los animales se sigue, según los experimentos, observando la excreción de porfirinas en orina por espectroscopía o determinando ALA, PBG y porfirinas en el mismo material biológico por columnas de intercambio iónico como se describe más adelante.

A los dos meses aproximadamente los animales comienzan a excretar porfirinas en cantidades apreciables por espectroscopía.

A los tres meses la orina de dichos animales exhibe ya una fuerte fluorescencia roja e intensas bandas de absorción en el visible, típicas de porfirinas. Esto indica que la orina contiene elevadas cantidades de estos últimos compuestos y que por lo tanto los animales están fuertemente porfíricos.

I.1.b. El HCB se administra de la misma forma que en a. El FB se incorpora en el agua de bebida de los animales. Se suspende la droga sólida (FB) en 2 ml de HONa 2 N y se lleva a 1 litro con agua de la canilla. Se coloca sobre un agitador magnético y se eleva la temperatura

hasta 40°C; se agita en esta forma hasta que se disuelve dando una concentración final de 1 g/l. El FB se comienza a administrar 1 semana antes que el HCB. El estado de porfiria se sigue de la misma forma que en a).

I.1.c. El PCF técnico o purificado se suspende en agua con ayuda de Tween 20 de modo que la concentración final es de 4.2 mg/ml.

Para obtener una buena suspensión se realiza el mismo procedimiento que con HCB.

El PCF técnico se administra a las ratas en dosis de 45-55 mg/kg por día en el primer mes; después de este período la dosis se incrementa a 70-90 mg/kg. El esquema de la administración de PCF purificado es de: 110-140 mg/kg para el primer mes; 170-195 mg/kg para el segundo mes y 195 mg/kg para los siguientes 4 meses.

I.2. En embriones de pollo.

Se utilizan huevos fertilizados de la cepa White Leghorn. La edad del embrión se calcula como el número de días en que se comenzó la incubación. Se estudió el efecto del PCF purificado en embriones de pollo de 17

días. El compuesto en estudio se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO). Se seleccionó el DMSO debido a que muchas drogas se disuelven rápidamente en este solvente y el mismo no produce toxicidad.

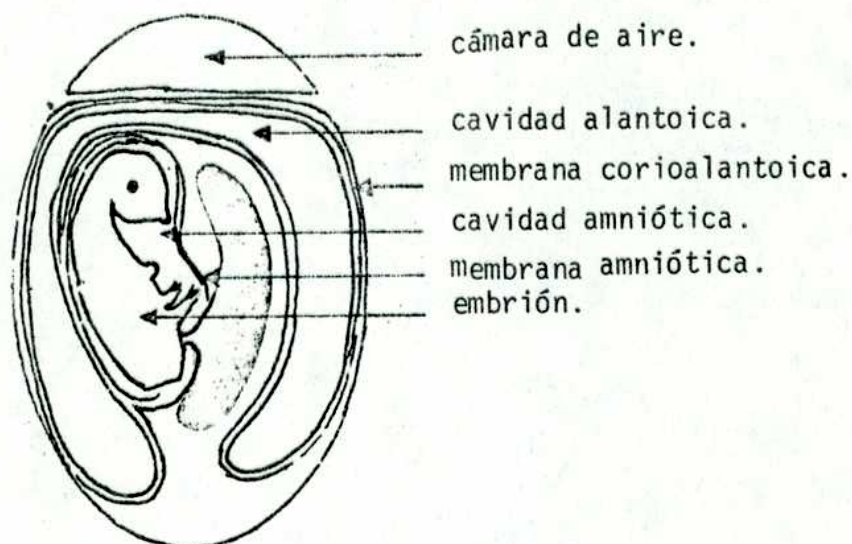
Para inyectar la droga se marca con un lápiz la cámara de aire mirando el huevo a través del ovoscopio y se desinfecta luego la cáscara con un algodón embebido en etanol. Utilizando un punzón se hace un pequeño orificio en la cáscara por encima de la cámara de aire y luego se agranda con una tijera cortando un disco de aproximadamente 1 cm de diámetro. Con una pipeta Pasteur estéril se colocan 2 o 3 gotas de solución fisiológica estéril para transparentar la membrana corioalantoica y así poder ubicar mejor el embrión.

Las drogas se inyectan en los líquidos que rodean al embrión, tratando de no pinchar a éste, mediante una jeringa de 0.5 ml provista de una aguja descartable estéril 22 Gx 1 1/2. Una vez inyectada la droga el orificio de la cáscara del huevo se sella con cinta scotch y se incuba el embrión a 37-38°C en cámara húmeda (incubadora).

Se trabaja siempre en condiciones estériles,

Cuando se completa el período de incubación los embriones son sacrificados y el hígado entero que pesa

aproximadamente 0.3 g se saca para extracción de porfirinas o para determinación de actividad enzimática (159, 160).



II. EXTRACCION Y ESTIMACION DE PORFIRINAS EN EL HIGADO DE EMBRION DE POLLO.

El embrión de pollo se sacrifica por decapitación, se extrae el hígado cuidando de no dañar la vesícula, se lava con solución fisiológica, se seca y se pesa. Este órgano de aproximadamente 0.3 a 0.5 g de peso, se homogeneiza en un potter con 5 ml de mezcla AcOEt:AcOH (4:1 v/v). Se centrifuga durante

15 min a 15.000xg y el sobrenadante se coloca en una ampolla de decantación que contiene 10-12 ml de AcONa 3%. El precipitado se macera con 5 ml de mezcla AcOEt: AcOH y se vuelve a centrifugar. El sobrenadante se reúne con el anterior. Esta operación se repite hasta llegar a fluorescencia negativa en el sobrenadante. Se agitan suavemente los sobrenadantes y se separa la fase acuosa. La fase orgánica se lava 2 veces con 10 ml de AcONa 3% reuniendo las fases acuosas. A la fase acuosa se le extraen las porfirinas con AcOEt hasta fluorescencia negativa. Los extractos orgánicos se lavan con 10 ml de AcONa 3% para eliminar el posible AcOH que pudo haber quedado en la fase AcOEt.

Se reúnen las fases AcOEt y se extraen las porfirinas con ClH 5%. La fase clorhídrica se filtra a través de papel de filtro Whatman N°42 embebido en ClH 5% y se recoge en tubos graduados. Se repite la extracción con ClH 5% hasta llegar a fluorescencia negativa. Se realizan las lecturas fluorimétricas en un fluorómetro Beckman utilizando como standard una solución de Copro III en ClH 5%.

III. EXTRACCION Y ESTIMACION DE PORFIRINAS EN HIGADO, RINON Y BAZO DE RATAS.

Los animales se sacrifican por decapitación. Una vez sangrados, los hígados, bazos y riñones se extraen y enfrían

inmediatamente sobre hielo, se lavan con solución fisiológica fría, se pesan y homogeneizan con ClK 0,154 M en una relación 1:5 p/v. Una cantidad determinada de homogenato (entre 1 y 3 ml para los normales y 0,3 y 1 para los porfíricos), se desproteiniza con ClH concentrado para llevar la concentración de ácido a 5%. Los precipitados se filtran y lavan hasta fluorescencia negativa. El contenido de porfirinas totales se determina evaluando los extractos ácidos en espectrofotómetro en la banda de Soret realizando la corrección de Allen para porfirinas según fórmulas de Rimington y Sveinsson (161),

$$A_{\text{corr}} = \frac{2 A_{\text{máx.}} - (A_{380} + A_{430})}{1,84}. \text{ En estos casos se utiliza como}$$

coeficiente de extinción un coeficiente medio calculado en base a los coeficientes individuales (162) de cada porfirina y a los % de cada una de ellas en la mezcla como se detalla luego en la parte de cromatografía.

IV. EMPLEO DE RESINAS DOWEX,

IV.1. Preparación de los intercambiadores.

IV.1.a. Resina aniónica Dowex A.G.1-X₈ 200-400 mesh.

Si la resina se adquiere en forma acetato, está lista para ser usada. Se la suspende en agua destilada y decanta repetidamente hasta que el líquido sobrenadante sea completamente claro. Si está en forma cloruro, se suprime el lavado indicado y se la convierte

en la forma acetato mediante tratamiento con AcONa 3 M. Para ello se arma una columna grande y en ella se coloca la resina. Se lava ésta con AcONa 3 M hasta cloruros negativo. Se puede utilizar AcONa saturado para acelerar el proceso. Luego se lava con agua hasta obtener reacción negativa de acetato en el eluido. Esto se comprueba con nitrato de plata.

IV.1.b. Resina catiónica Dowex A.G.50-X₈ 200-400 mesh.

Las resinas que intercambian cationes producen pequeñas cantidades de una sustancia roja por estacionamiento prolongado, de allí que la resina deba ser reciclada cuando se la adquiere comercialmente. Se debe pasar la resina a la forma Na⁺ por tratamiento con NaOH y luego a la forma H⁺ con ClH.

Para ello la resina se suspende en 2 volúmenes de NaOH 4 N y se calienta en un baño de vapor durante 6 a 8 horas agitándose ocasionalmente con una varilla. En este intervalo de tiempo se cambia 2 veces la solución de NaOH. Se lava luego con agua hasta pH neutro y se filtra por embudo Büchner.

Para convertir el intercambiador en su forma protonado se la suspende en 4 volúmenes de ClH 2 N, se calienta en un baño de vapor durante 8 horas, cambiando la solución clorhídrica a las 4 horas de calentamiento.

Después de decantar se lava con agua hasta eliminar el ión cloruro, lo cual se comprueba con nitrato de plata, y se filtra por embudo Büchner. Se deja secar y se guarda en botella oscura.

IV.2. Determinación de precursores (ALA y PBG) y porfirinas en orina, (163)

Se preparan columnas de vidrio de 18 cm de largo x 1 cm de diámetro. En la parte inferior se introduce una pequeña cantidad de lana de vidrio. Luego se agrega aproximadamente 2 ml de resina Dowex 1 (aniónica) o Dowex 50 (catiónica) las cuales recibieron el tratamiento que se indica en IV.1. Sobre las columnas así preparadas se siembra 1 ml de orina ajustada a pH 5.5 con AcONa saturado. Si la orina se encuentra en pH básico se la acidifica con ClH concentrado hasta pH 4, se mezcla para disolver los fosfatos presentes y se reajusta a pH= 6 con AcONa saturado. Una vez sembrado el ml de la muestra de orina en la columna aniónica, abriendo la llave se recoge el líquido en un tubo (163). Se lava la columna dos veces con 3 ml de agua destilada, agregándolo al mismo tubo. Se guardan estos eluidos para la determinación de ALA. El PBG que queda retenido en la columna se eluye con 3 ml de AcOH 1 N, se agrega nuevamente AcOH hasta que no salga más PBG de la columna, lo que se comprueba en placa de toque utilizando reac-

tivo de Ehrlich. Se mide el volumen eluido de la columna y se determina PBG con el reactivo de Ehrlich modificado (164) como se detalla más adelante.

Después de eluir todo el PBG se eluyen las porfirinas que quedaron retenidas en la columna, con ClH 10% hasta llevar las columnas a fluorescencia negativa, observando los eluidos con la lámpara ultravioleta. Los líquidos eluidos y guardados para la determinación de ALA se transfieren cuantitativamente a una columna catiónica (Dowex 50) y se deja drenar descartándose el eluido. Se lava con 30 ml o más de agua para eliminar fundamentalmente la urea. Esto se comprueba agregando reactivo de Ehrlich a una muestra de eluido. Si hay urea se observará un color amarillo característico. Una vez eliminada la urea se lava la resina con 2 ml de AcONa 0.5 N. Se eluye luego con 15 ml de AcONa 1 N y se lleva a 20 ml con buffer acetato pH 4.6.

La columna Dowex 1 se lava haciendo pasar 20 ml de AcONa 3 M y luego agua hasta que no tenga más acetato lo cual se comprueba agregando unas gotas de NO_3Ag al eluido.

La columna Dowex 50 se lava haciendo pasar primero 6 ml de ClH 4 N luego 6 ml de ClH 2 N y finalmente 6 ml de ClH 1 N. Luego se lava con agua hasta cloruros negativo.

Con estos tratamientos las columnas están en con-

diciones de ser reutilizadas para nuevas determinaciones.

IV.3. Determinación cuantitativa de ALA y PBG eluidos de las columnas. (164)

Para determinar PBG se toma una alícuota de 1.5 ml y se agrega 1.5 ml de reactivo de Ehrlich. Después de 10 min. se lee la absorbancia de la solución coloreada a 555 nm en un espectrofotómetro DB.

El reactivo de Ehrlich (164) se prepara con 1g de 4-dimetilaminobenzaldehído, al cual se le agrega 30 ml de AcOH glacial y 8 ml de ClO₄H 70% completando a 50 ml con AcOH glacial. Para determinar ALA, a 10 ml de líquido eluido se agrega 0.2 ml de acetyl acetona. Se calienta en un baño en ebullición durante 10 min. para pirrolizar el ALA. Se realiza luego la reacción colorimétrica con reactivo de Ehrlich como se indicó para PBG.

IV.4. Cálculos para determinar ALA, PBG y porfirinas eluidas de las columnas.

$$\text{nmoles PBG/ml} = \frac{(A_M - A_B)}{E_M} \times \frac{V_e}{V_a} \times \frac{V_d}{V_o} \times 10^6$$

A_M = absorbancia de la muestra.

A_B = absorbancia del blanco.

E_M = 6.2 x 10⁴ (163).

V_e = volumen final de la colorimetría (ml).

V_a = volumen de la alícuota de la colorimetría.

V_o = volumen sembrado.

V_d = volumen final.

$$\text{nmoles de PBG/ml} = \frac{(A_M - A_B) \times 2 \times 10^3}{6.2}$$

Los cálculos para la determinación de ALA se realizan de la misma forma que para la determinación de PBG. El coeficiente de extinción empleado fue $E_M = 6.2 \times 10^4$. Este coeficiente se determinó como se detalla luego en Resultados. Para realizar los cálculos para la determinación de porfirinas se tomó un coeficiente medio en ClH considerando que en la muestra existe 25% de Copro, 30% de Firia y 45% de Uro, obteniéndose un $K_{1/2} = 1.77 \mu\text{g/ml}$ como se detalla luego en Resultados.

V. Esterificación de las porfirinas.

V.1. Esterificación.

Las porfirinas libres previamente secadas en desecador se esterifican con una mezcla de MeOH - SO_4H_2 (19:1) v/v en cantidad suficiente para disolverlas (20 ml). La solución se deja esterificar durante 24-48hs en la oscuridad y a temperatura ambiente. Si la mezcla contiene Proto se deja esterificando entre 18-24 hs.

V.2. Pasaje a cloroformo.

A la solución de porfirinas anterior se agrega 1/2 volumen de cloroformo y se lleva a pH 4,5 con AcONa saturado. Se coloca en una ampolla agua destilada y se vuelca sobre ella la solución. Se agita suavemente, se separan 2 fases; la fase clorofórmica se separa y la fase acuosa se lava con cloroformo hasta fluorescencia negativa. Se lava la fase clorofórmica con agua destilada y luego con ClNa 7%. Con este último se agita violentamente para romper la emulsión. Todos los lavados se extraen con cloroformo antes de desecharlos.

Por último, el extracto clorofórmico final se filtra por papel embebido en cloroformo. Se recoge en balón con cuello esmerilado donde se concentra al vacío a baño maría. El extracto obtenido se somete a posterior estudio.

VI. IDENTIFICACION DE LAS PORFIRINAS. CROMATOGRAFIA EN PAPEL DE LOS ESTERES METILICOS DE PORFIRINAS.

VI.1. Método de Falk y Benson. (165).

Este método permite la separación de las porfirinas esterificadas de acuerdo al número de grupos carboxílicos. Es decir, separa Uro, Firia, Hexa, Penta, Copro y Proto enumeradas de acuerdo a la movilidad creciente.

La cromatografía es de tipo ascendente y consta de 2 corridas en el mismo sentido. La primer cuba está saturada con cloroformo y la segunda con dioxano.

En la primer corrida, que tiene por objeto dejar las impurezas en la línea de siembra, que se descarta, se usa cloroformo: kerosene en la relación 2:1 v/v. En la segunda corrida que se realiza en cuba independiente se usa como solvente de desarrollo una mezcla de kerosene; dioxano en la relación 2,5:1 v/v.

El revelado de esta cromatografía, se realiza por observación de la fluorescencia que exhibe bajo luz ultravioleta. Se marcan cada una de las bandas, se cortan y se eluyen con cloroformo en vasos de precipitado pequeños y separados.

Se recogen los eluidos en tubos graduados, se miden los volúmenes y se leen las absorbancias en un espectrofotómetro DB. Las lecturas se realizan entre 400 y 410 nm. buscando el máximo de cada una de las porfirinas eluidas.

Se calculan los nmoles de cada una en la cromatografía sembrada, usando la recíproca de los coeficientes de extinción dados por Salum y col. (166). Para las porfirinas de 5- y 6-COOH se usan los valores calculados interpolando los valores correspondientes a las porfirinas de 7-COOH y de 4-COOH, suponiendo una función lineal entre el número de grupos COOH y la recíproca del coeficiente de extinción. Conociendo estos resultados y los nmoles totales recuperados en la cromatografía se obtuvieron los % de cada una de las porfirinas en la mezcla.

VI.2. Método de Cornford y Benson (167).

La primera corrida se hizo con los mismos solventes que el

método anterior.

La segunda corrida se realizó en una cuba saturada con dioxano y el solvente de desarrollo fué una mezcla de kerosene: dioxano en la relación 4:1 v/v.

Este método permite la separación de las mismas porfirinas arriba mencionadas y además mediante su empleo se logra una buena separación de los esteres metflicos de los isómeros I y III de la Uro.

VII. PREPARACION DE URO III A PARTIR DE TURACINA.

Se obtiene Uro III pura a partir de turacina y se caracteriza físicamente para confirmar la naturaleza de dicha Uroporfirina. La Uro se desacompleja del Cu al que se halla ligado en la turacina por acción del ácido sulfúrico. Las plumas se ponen en contacto con una cantidad de ácido suficiente para mojarlas bien, se las remueve y macera durante varios min. a fin de extraer el pigmento. El extracto se decanta y las plumas se vuelven a tratar sucesivamente de la misma manera con nuevas porciones de sulfúrico hasta que el extracto sale, prácticamente incoloro.

La solución sulfúrica de la porfirina libre se mezcla con suficiente MeOH para obtener una mezcla esterificante de MeOH: SO_4H_2 (5% v/v). Después de 24-48 hs el ester se pasa a cloroformo como se describe en el párrafo V de este mismo capítulo y la solución clorofórmica se evapora a sequedad bajo presión reducida.

La mezcla seca de ésteres se disuelve en benceno. La solución así obtenida se cromatografía en columna de CO_3Ca . La adsorción se lleva a

cabo con benceno. El desarrollo de la misma se realiza con una mezcla de benceno: cloroformo (3:1 v/v). Se obtuvieron 5 bandas de las cuales una de ellas exhibía una intensa fluorescencia roja.

Dicho material se purifica adicionalmente cromatografiándolo en columnas de OMg (168) o en papel Whatman N°3 usando el sistema de solventes de Falk y Benson.

En los procedimientos cromatográficos sobre OMg se usa cloroformo como solvente de adsorción y el desarrollo se realiza usando sucesivamente mezclas que contienen 0.5:0.7 y 0.9% v/v de MeOH en cloroformo. Las diferentes bandas se cortan y eluyen con 2% de MeOH en cloroformo.

Las bandas individuales se recromatografian usando para el desarrollo mezclas de MeOH: cloroformo, en distintas proporciones de acuerdo a la fracción de porfirinas a recromatografiar.

El material así cromatografiado se purifica adicionalmente por cristalización de metanol cloroformo, dando un producto bien cristalino con forma típica de Uro III. Detalles de estas técnicas son descriptos por San Martín de Viale (169).

VIII. PORFIRINOGENOS.

VIII.1. Preparación de amalgama de sodio.

Se calientan 30 g de mercurio a unos 30-40°C en una cápsula de porcelana y con una varilla larga con extremo estirado en punta se pinchan los trozos de sodio (1 g), recientemente cortados y mantenidos bajo kerosene incoloro los que se introducen rápidamente de uno en uno en la masa de mercurio. Se tra-

baja en campana cuidando las posibles proyecciones y vapores de mercurio, sobre todo en los primeros agregados de sodio que es cuando reacciona más violentamente.

La amalgama, que endurece al enfriar, se guarda en frasco bien seco y perfectamente cerrado, el que se introduce en otro recipiente con cloruro de calcio.

VIII.2. Preparación de porfirinógenos.

Los porfirinógenos se preparan sobre la base de métodos de Fisher y Stern (170) y de Mauzerall y Granick (72) reduciendo las soluciones de porfirinas libres en OHNa 25 mM por agitación vigorosa con amalgama de sodio 3% (0,2 a 1 g/ml de solución) recientemente pulverizada. Entre 10 y 20 min. la porfirina se reduce a porfirinógeno, lo que se observa por la decoloración de la solución y pérdida de la fluorescencia. La solución se filtra con vacío a través de una plaquita filtrante de poro fino, provista de un pequeño papel, sin lavar.

Se lleva luego a pH 7.0-7.2 con PO_4H_3 40% p/v bajo N_2 y colocando el tubo kitasato en hielo y así se mantiene hasta ser pipeteado, operación que se realiza lo más rápido posible. Todas las operaciones se realizan bajo tenue luz roja. Los porfirinógenos así preparados se usan inmediatamente (169).

IX. COLUMNAS DE SEPHADEX G-25.

IX.1. Preparación.

A un volumen de aproximadamente 1 l de agua destilada se agre-

ga 25 g de Sephadex G-25 de poro grueso. Se deja durante una noche esta suspensión en agua para que se hinche el gel.

Se construye una columna de vidrio de 35 cm de altura y 2.5 cm de ancho con un esmeril en la parte superior. Se adiciona lana de vidrio en la parte inferior y se va agregando lentamente y en forma continua el Sephadex en suspensión hasta tener en la columna una altura de aproximadamente 30 cm.

Estas columnas se equilibran luego con 2 volúmenes de buffer fosfato de potasio pH 7 u 8 según la enzima a determinar.

IX.2. Lavado.

Después de usar las columnas se pasa 2 volúmenes de agua y luego ClK 1M. Esto se realiza debido a que con agua sola no se puede eliminar todas las porfirinas adheridas a la columna mientras que con el agregado de esta sal se eliminan.

Se agrega ClK hasta fluorescencia negativa de porfirinas en el eluido de la columna. Se lava la misma nuevamente con agua hasta cloruros negativos en el eluido, lo cual se comprueba por agregado de nitrato de plata al mismo,

X. DETERMINACION DE HIERRO TOTAL.

Se realiza en homogenatos, sobrenadantes de 11.000 g y sobrenadantes de 11.000 g pasados por columnas de Sephadex G-25. Se toma una alícuota entre 0.5 y 1 ml de la solución correspondiente. Se seca en estufa, y se lleva a una mufla a 550°C (171) durante 2 hs. Se sacan las cápsulas, se

dejan enfriar y se añaden gotas de agua para disolver la materia orgánica. Se seca nuevamente en estufa y se deja en la mufla 30 minutos. Este procedimiento se realiza varias veces, hasta la desaparición de la materia orgánica. En la parte interior de la cápsula se observa una coloración marrón clara que indica la presencia de hierro.

El hierro de cada una de las cápsulas se pasa a matraces de 25 ml disolviéndolo con ClH 20%. Se enrasa el matraz con agua destilada, se homogeiniza y se pipetea una muestra de 1 ml en un tubo de ensayo para realizar la colorimetría. Se agrega 1 ml de citrato de sodio 25% para llevar a pH 3.5; 2 ml de orto-fenantrolina 0.25% y 1 ml de hidroquinona 1% y se lee la absorbancia a 508 nm, después de 1 hora de agregados los reactivos.

Se realiza una curva de calibración con sulfato de hierro correspondiendo a una recta en la zona de lectura, la cual se incluye en Resultados.

XI. DETERMINACION DE HIERRO NO HEMICO. (172)

Se pipetea en un tubo de ensayo 0.5 ml de homogenato, sobrenadante de 11,000 g o sobrenadante de 11.000 g pasado por columna de G-25 provenientes de hígado de rata normal o intoxicada con HCB.

Se agrega 5 ml de reactivo (buffer acetato 0,5 M pH 5 conteniendo: α α' dipiridilo 0.075%, e hidroxilamina ClH 0.1%) y se lleva a 7.5 ml con agua destilada. El contenido se homogeiniza y el tubo se calienta en un baño hirviendo por 5 min. Durante el calentamiento se forma el complejo dipiridilo hierro y las proteínas se coagulan. El tubo se enfría y el contenido se filtra a través de papel Whatman N°42. La intensidad del color

se mide en un espectrofotómetro DB a 520 nm. (171).

Para la determinación de Fe total por esta metodología se toma una alícuota de 0.5 ml de muestra, se calienta a baño maría a una temperatura de 50°C , y se adiciona 0.1 ml de H₂O₂; la mezcla se agita ocasionalmente durante 5 min y se agrega 0.5 ml de SO₃Na₂ para destruir el exceso de H₂O₂ que interfiere con la reacción colorimétrica. Después de dejar la mezcla reposar 5 min se agrega 1 ml del mismo reactivo colorimétrico que para determinar hierro no hémico y el tubo se calienta durante 15 min en un baño de agua hirviendo.

Después de enfriar se agrega 4 ml de etanol, se filtra a través de papel Whatman N° 42 y la intensidad de color se mide en un espectrofotómetro DB a 520 nm (172).

XII. DETERMINACION DE HIERRO HEMICO.

Se realiza por el método del piridín hemocromógeno (173). Se toma; una alícuota de 1 ml de homogenato, sobrenadante de 11.000 g o sobrenadante de 11.000 g pasado por columna de G-25 de hígado de rata normal o intoxicada con HCB. Se agrega 1 ml de piridina y 0.5 ml de HONa .1N y 4.2 ml de H₂O. Se separa esta solución en 2 cubetas; a una de ellas se agrega 0.05 ml de Fe(CN)₆K₃ 3 x 10⁻³ M y a la otra 2 mg de ditionito de sodio. Se determina el espectro de la forma oxidada y reducida, como se indica en Resultados y se determina el Δ E.

XIII. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-S EN HIGADO DE RATAS.

Se decapita una rata. se extrae el hígado y se lava con solución

fisiológica fría, se pesa 1 g y se corta rápidamente en trozos pequeños homogeneizandolo en un Potter con 1.5 ml de una mezcla que contiene ClNa 0.9%, EDTA 0.5 mM, Tris ClH 10 mM pH 7.4 (18). Después de enjuagar el Potter se lleva a 3 ml con la misma mezcla de homogeinización. Se homogeiniza esta solución y se pipetea 0.5 ml en cada tubo que contiene la mezcla de incubación. Esta última consiste en glicina 10^{-1} M; EDTA 10^{-2} M y Tris 8×10^{-2} M. Se incuba al aire a 37°C y con agitación. Se desproteíniza con TCA 25% en frío. Se centrifuga a 2500 rpm durante 15 min. El sobrenadante se lleva a pH 4.6 con HONa 5 N.

Se pipetea 1 ml de esta solución en tubos de ensayo o tubos a rosca, se agrega 1 ml de buffer acetato 0.1 M pH 4.6 y 0.05 ml de acetyl acetona. Se calienta en agua hirviendo durante 10 min. para formar el pirrol. Se pipetea 1 ml de esta solución y se agrega 1 ml de reactivo de Ehrlich mercúrico.

El reactivo de Ehrlich mercúrico consiste en 1 g de 4-dimetilaminobenzaldehído al cual se le agrega AcOH glacial para disolver y 10 ml de ClO_4H 70%. Se completa a 55 ml con AcOH glacial y se agrega 150 mg de Cl_2Hg . Para calcular la actividad enzimática se emplea el siguiente factor.

$$\text{nmoles ALA/h.g hígado} = \frac{(A_M - A_B) \times 2.5 \times 2 \times 3 \times 10^6}{6.8 \times 10^4 \times 0.5} (A_M - A_B) \times 441.17$$

XIV. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-S EN EMBRION DE POLLO.

Los embriones se matan por decapitación 6 a 8 hs después de la

inyección con la droga en estudio como se describió en I.2. Los hígados se sacan , se colocan en solución fisiológica, se secan y se pesan. Se homogeinizan con la misma mezcla que para hígado de rata detallada en el tópico anterior (174), llevando el homogenato resultante a 4 ml. El medio de incubación contiene glicina 7.5×10^{-2} M , EDTA 10^{-2} M, fosfato de piridoxal 1.5×10^{-4} M, buffer Tris: ClH 6×10^{-2} M y 0,5 ml de homogenato. Se incuba a 37°C durante 1 h. al aire y con agitación. Se desproteiniza con TCA 25% en frío durante más de 1 hora. Se sigue el mismo procedimiento que en el tópico XIII.

XV. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-D. EN
HIGADO DE RATA.

Se mata el animal por decapitación, se extrae el hígado y se coloca rápidamente en solución fisiológica fría, se seca y se pesa. la cantidad necesaria, se corta en trozos pequeños y se homogeiniza con ClK 0.134 M en un potter en la relación 1:5 p/v. Se centrifuga 20 min a 11,000 xg, se descarta el pellet y se usa el sobrenadante como fuente enzimática.

El medio de incubación contiene ALA $3,75 \times 10^{-3}$ M, CySH $1,25 \times 10^{-2}$ M, Buffer fosfato de K 0,067 M y 0.05 ml de sobrenadante de 11,000 g de homogenato de hígado. La incubación se realiza en tubos de Thunberg y vacío (36). ALA se pipetea en la cabeza del tubo. Se realiza una preincubación de 1 h, al término de la cual se invierte el tubo, para que el ALA entre en contacto con el resto de mezcla de incubación y se incuba durante 1 h. Se desproteiniza con 0.1 ml de solución saturada de SO_4Cu en frío durante más de 30 min, y se centrifuga a 2,500 rpm durante

15 min. Se pipetea 1 ml de sobrenadante en un tubo de ensayo y 1 ml de reactivo de Moore y Labbé (175) (2 g de 4-dimetilaminobenzaldehído 25 ml de ClH (c) y se lleva a 100 ml con AcOH glacial). Se lee a los 7 min a 555 nm. Se utiliza el siguiente coeficiente,

$$\text{nmoles de PBG/h} = \frac{(A_M - A_B) \times \text{dil} \times 2 \times 10^6}{113.6 \times 226} = (A_M - A_B) \times 77.9$$

XVI. MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE PBG-asa.

Se prepara un sobrenadante de homogenato de 11,000 g como en el tópicó XV.

Se incuba en oscuridad, aerobiosis y con agitación, durante 1 h. Se trabaja constantemente en oscuridad hasta terminar la incubación para evitar polimerización del PBG.

La mezcla de incubación contiene buffer fosfato de potasio 0,067 M pH 8.1 y PBG 16×10^{-3} mM en un volumen total de 2.5 ml, Se desproteíniza con ClH (c), (0,28 ml) para que la mezcla de incubación posea una concentración final de ClH igual a 5%. Se deja en frío durante 1 h y a la luz y se filtra a través de papel Whatman N° 42 embebido en ClH 5%. Se lava con ClH 5% hasta fluorescencia negativa de porfirinas en el filtrado, Se lee el volumen recogido, y la absorbancia de porfirinas, a la longitud de onda de absorbancia máxima en la banda de Soret (406 nm). Se lee también la absorbancia a 380 nm y a 430 nm para realizar la corrección de Allen como en el tópicó 3, Las lecturas se realizan en un espectrofotómetro Beckman DB. Se determinan los nmoles de porfirinas formados multiplicando el vo-

lumen eluido por la absorbancia corregida por el coeficiente medio K en ug/ml (K = 1.77).

En el caso de determinar actividad en animales porfiricos el sobrenadante de 11.000 g se pasa a través de columnas de G-25 para eliminar las porfirinas endógenas.

XVII. MEDICION DE ACTIVIDAD DE URO-D.

Se prepara un sobrenadante de homogenato de 11.000 g de la misma forma que en el tópicó XV. Se incuba a 37°C en oscuridad anaerobiosis y con agitación durante 30 min. El medio de reacción, en un volumen de 3ml, contiene buffer fosfato de potasio 0,067 M pH 7,0, GSH 10^{-3} M, EDTA 10^{-4} M, Uro'gen III 2 μ M y 0.3 ml de preparación enzimática (115). Las preparaciones enzimáticas correspondientes a ratas porfiricas se pasan a través de columnas de G-25. Se realiza esto para eliminar las porfirinas endógenas. En este caso se incuba 1 ml de eluido de las columnas ya que las mismas diluyen la muestra de 2,5 a 3 veces.

El porfirinógeno (0.15 ml) se pipetea en oscuridad bajo una tenue luz roja.

Una vez transcurridos los 30 min de incubación, se colocan los tubos en frío, se abren, se les agrega ClH (c) para tener una concentración final en ClH del 5% y se deja 30 min, bajo luz blanca y en frío para que se desproteíne y para que los porfirinógenos se oxiden a porfirinas.

Finalmente se retiran del hielo y se filtran por papel SS 595 o 597 plegado y previamente embebido en ClH 5%. El filtrado se recoge en erlenmeyers. Se enjuaga el cuerpo y la cabeza del tubo de Thunberg con

ClH 5% hasta fluorescencia negativa, Se colocan los erlenmeyers en desecadores y se hace vacío para que se sequen las porfirinas. Una vez secas se esterifican, se pasan a cloroformo y se realizan las cromatografías correspondientes.

Los resultados se expresan como desaparición del sustrato (Uro'gen), como aparición del producto final (Copro'gen) o bien como formación de cada uno de los productos de decarboxilación,

La desaparición del Uro'gen (8-COOH) es expresada como la suma de los productos formados, ya sea como nmoles de porfirinas de 7- +6- +5- +4-COOH o como suma de los porcentajes de cada uno de ellos.

XVIII. DETERMINACION DE PROTEINAS.

Se realiza por el método de Lowry y col (176). Se realiza una dilución que generalmente es de 0,1 ml a 10 ml. Se pipetea una alícuota en un tubo y se lleva a 0.4 ml con agua. Se agrega 2 ml de solución alcalina de Cu, se espera 10 min y se agrega 0.2 ml de reactivo diluido de Folin agitando inmediatamente por inversión. Se dejan los tubos 30 min a temperatura ambiente y se lee la absorbancia a 660 nm, Se incluye un testigo de albúmina y se calcula la concentración de proteínas de la siguiente manera:

$$\text{mg proteínas/ml} = (A - B) \times \frac{1}{\text{tg}} \times \text{dilución} \times \frac{1}{\text{alícuota}}$$

A: absorbancia de la muestra.

B: absorbancia del blanco.

tg: tangente de la curva de calibración realizada con albúmina.

RESULTADOS.

I. CONDICIONES EXPERIMENTALES.

1. Determinación de las condiciones experimentales de distintas enzimas del camino del hemo.

En este trabajo de investigación se determinaron las actividades de ALA-S, ALA-D, PBG-asa y Uro-D. Para ello se trató de realizar un único homogenato que sirviera para determinar la actividad de las enzimas citoplasmáticas.

Para determinar ALA-S, enzima mitocondrial, se homogenizó separadamente del resto usándose el homogenato tal cual sin realizar ninguna centrifugación previa. La homogenización se realizó en una mezcla que contiene buffer Tris-ClH 10 mM pH 7.4, ClNa 0.9% y EDTA 0.5 mM siguiendo luego el método de Marver y col (3). Para el resto de las enzimas solubles se buscaron las condiciones óptimas para poder homogeneizar en ClK 0.134 M y centrifugar luego a 11,000 g. Este sobrenadante ya era utilizado para determinar Uro-D.

1.a. Determinación de las condiciones óptimas de incubación de ALA-D.

Todas las manipulaciones, salvo en casos de tratamiento por calor se llevaron a cabo entre 0 y 4°C.

- 1.a₁. Homogenato: Se sacrificó una rata normal, se sacó el hígado, se lavó con solución fisiológica fría (ClNa 0.9%) con el objeto de eliminar la sangre del tejido y se secó sobre papel de filtro. Se pesaron 2 porciones del mismo de 1 g de cada una y se realizaron 2 homogenatos utilizando un homogenizador del tipo Potter Elvehjem con ayuda de un agitador mecánico.

Homogenato 1: Se realizó con sacarosa 0.25 M en la relación 1 g de hígado a 5 ml con la solución homogeneizante. Este homogenato se tomó como control de comparación ya que Ferramola (177) utilizaba sacarosa 0.25 M para homogeneizar hígado bovino y determinar ALA-D.

Homogenato 2: Se realizó con ClK 0.134 M en la relación 1 g de hígado a 5 ml con la solución homogeneizante.

Ambos homogenatos fueron centrifugados a 11.000 g por 20 min.

La mezcla de incubación contenía 0,4 ml de sobrenadante de homogenato de 11.000 g, 1 ml de buffer PO_4HK_2/PO_4H_2K , 0.1 ml de CySH 0.25 M, 0.1 ml de ALA 0.05 M y 0.4 ml de agua obteniéndose un volumen final de 2 ml.,

La incubación se realizó en tubos de Thunberg en anaerobiosis. El sustrato se pipeteó en la cabeza del tubo de Thunberg para poder realizar una preincubación.

En la Tabla I se observa que hay muy poca variación en la actividad específica de la enzima homogeneizando con sacarosa o con ClK. Se utilizará por lo tanto para homogeneizar ClK 0.134 M.

1.a₂ · Tiempo de preincubación: Como tiempos de preincubación se probaron 30 min y 60 min (Tabla II). Al realizar la preincubación más larga la actividad específica aumenta 26%. Por lo tanto se trabajará con un tiempo de preincubación de 60 min.

TABLA I. SOLUCIONES DE HOMOGENEIZACION DE ALA-D.

SOBRENADANTE DE 11.000 G 20 MIN	ACTIVIDAD ESPECIFICA NMOLES PBG/H/MG PROT.
SACAROSA 0,25 M	11,36
CLK 0,134 M	13,8

TABLA II. TIEMPO DE PREINCUBACION DE ALA-D.

SOBRENADANTE DE 11.000 G 20 MIN	TIEMPO DE PREINCUBACION	ACTIVIDAD ESPECIFICA NMOLES PBG/H/MG PROT.
1	30 MIN.	65,4
2	60 MIN.	82,6

La homogeneización se realizó con CLK 0.134 M.

1.a ₃. Determinación de la cantidad de proteínas enzimáticas "ALA-D" en el medio de incubación.

La cantidad de nmoles de PBG/h formados en función de los mg de proteínas incubadas es lineal en todo el rango probado (Fig. 16). Una cantidad óptima de proteínas a incubar sería alrededor de 8 mg que correspondería a 0.2 ml de sobrenadante de homogenato 11.000 g 20 min. Esta cantidad se podría disminuir hasta llegar a incubar 2 mg de proteínas. Con esta cantidad se formarían 35 nmoles de PBG/h los cuales se pueden determinar bien por el método colorimétrico de Ehrlich para la determinación de la actividad de esta enzima.

La cantidad de proteínas a incubar depende por lo tanto de los nmoles de ALA necesarios para saturar a la enzima.

1.a ₄. Determinación de la concentración de ALA en el medio de incubación.

Se buscaron las condiciones óptimas en las cuales la enzima esté saturada por su sustrato, ALA, y se utilice la menor cantidad de este.

Para ello se realizó la curva de nmoles de PBG/h/mg prot. para 8 mg-4mg y 2 mg de proteínas. En la Fig. 17 se muestra la curva correspondiente para 2 mg de proteína. En la misma los nmoles de PBG/h/ mg prot. son constantes para una concentración de ALA entre 3 y 4 mM en el medio de incubación. Se eligió para incubar una concentración de 3.75 mM de ALA en el medio de incubación. Todas las determinaciones enzimáticas se realizaron con 2 mg de proteínas en el medio de incubación ya que con esto se obtenían buenas lectu-

Fig. 16

ACTIVIDAD DE ALA-D EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS. - 86 -

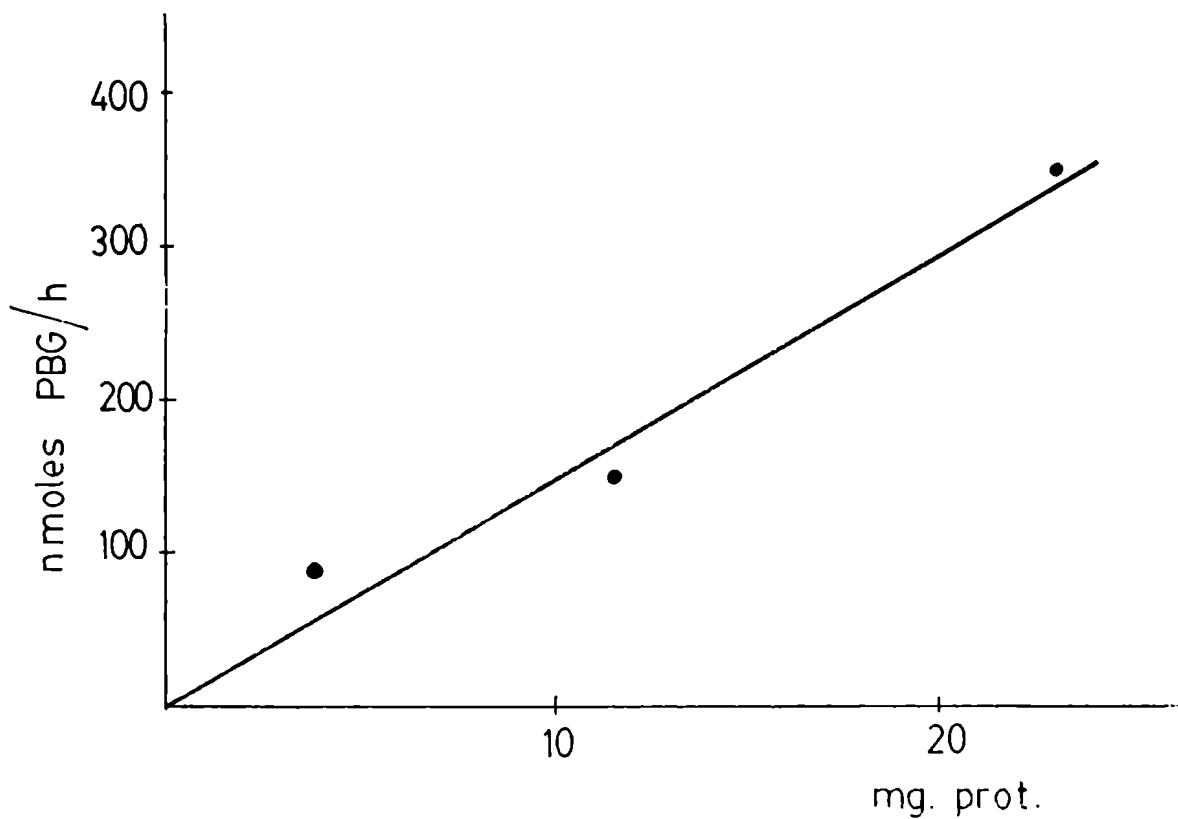
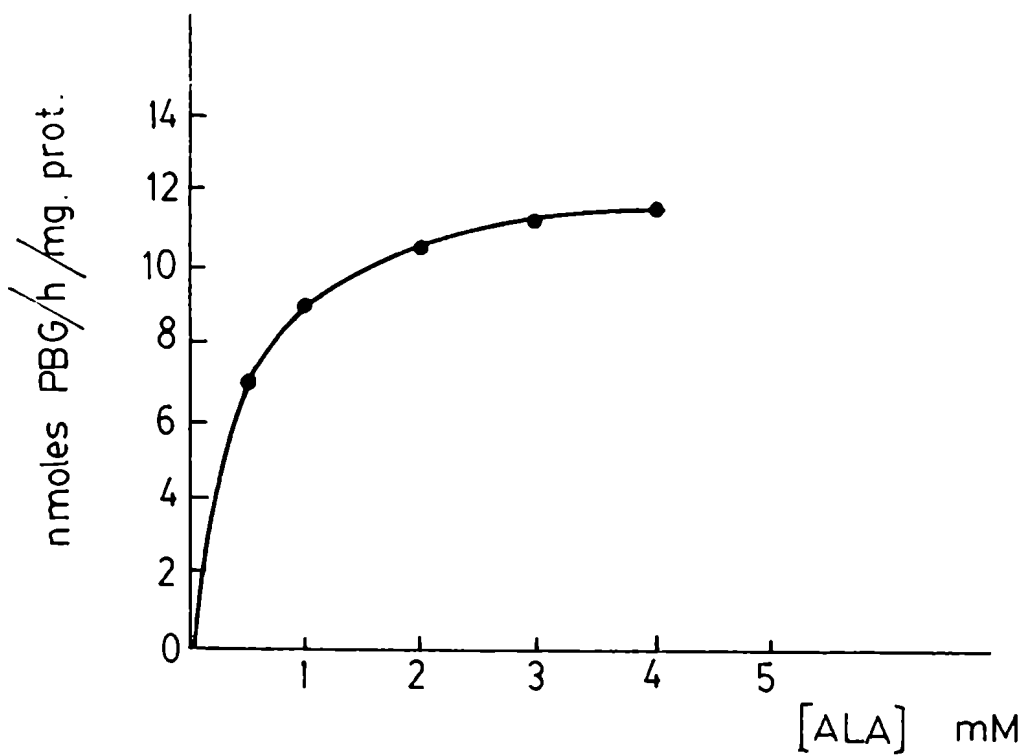


Fig. 17

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ALA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALA-D



ras de PBG y no era necesario la adición de cantidades elevadas de ALA para saturar a la enzima como cuando se incubaba 4 mg u 8 mg de proteínas.

Conclusiones.

Para determinar actividad de ALA-D en hígado de rata se extrajo el mismo, se lavó con solución fisiológica, se secó con papel de filtro, se centrifugó a 11.000 g 20 min y se homogeneizó con ClK 0,134 M en la proporción 1 g a 5 ml.

El medio de incubación contenía ALA 3.75×10^{-3} M CySH 1.25×10^{-2} M, Buffer $\text{PO}_4\text{HK}_2/\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0.067 M y 0.05 ml de sobrenadante de 11.000 g 20 min de homogenato de hígado que correspondía a 2 mg de proteínas.

Se realizó una preincubación de 60 min y una incubación también de 60 min. en anaerobiosis. Se desproteinizó con 0.1 ml de solución saturada de SO_4Cu y se siguió el procedimiento como se indica en Métodos.

1.b. Determinación de las condiciones óptimas de incubación de PBG-asa.

Todas las manipulaciones, salvo en el caso de tratamiento por calor, se llevaron a cabo entre 0-4°C.

1b . Homogenato: Se sacrificó una rata normal, se sacó el hígado, se lavó con solución fisiológica fría (ClNa 0.9%) con el objeto de eliminar la sangre del tejido y se secó sobre papel de filtro. Se pesaron 3 porciones del mismo de 2 gramos cada una y se realizaron 3 homogenatos utilizando un homogeinizador del tipo Potter-Elvehjem

con ayuda de un agitador mecánico.

Homogenato 1: Se realizó con ClK 0.134 M en la relación 1g de hígado a 5 ml con mezcla de homogeneización.

Homogenato 2: Se realizó con sacarosa 0.25 M en la relación 1 g de hígado a 5 ml con mezcla de homogeneización. Este homogenato se tomó como control ya que Sancovich (178) utilizaba sacarosa 0.25M como medio de homogeneización para determinar PBG-asa.

Homogenato 3: Se realizó con buffer Tris-ClH 0.05 M pH 7.4 en la relación 1 g de hígado a 5 ml con mezcla de homogeneización. Los 3 homogenatos fueron centrifugados a 11.000 g durante 20 min. A una alícuota (1.25 ml) de sobrenadante 1 y 2 se agregó buffer $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$ 0.134 M pH 7.4 y a una alícuota de sobrenadante 3 buffer Tris-ClH 0.05 M pH 7.4.

Como sustrato se agregó 50 nmoles de PBG. El volumen total de mezcla de incubación fué de 5ml. Se realizaron los blancos correspondientes se incubó a 37°C 2 h. en aerobiosis y oscuridad y se desproteinizó con ClH(c) para obtener una conc. de ClH 5%. Se dejó oxidar en frío y haciendo incidir luz blanca sobre los incubados. Después de filtrar y lavar el precipitado que queda retenido en el papel con ClH 5% hasta fluorescencia negativa del eluido, se leyó la cantidad de porfirinas formadas en un espectrofotómetro. Se obtuvieron las siguientes actividades específicas:

Homogenato	Activ. específica nmoles porf./mg prot.
1 (ClK 0.134 M)	0.87
2 (sacarosa 0.25 M)	0.70
3 (Tris-ClH 0.05 M)	0.54

De acuerdo a estos resultados se eligió como mezcla de homogeneización la correspondiente al homogenato 1 o sea ClK 0.134M en la relación 1→5.

1.b₂ . Determinación del tiempo de incubación.

Se determinó la actividad específica de la enzima para distintos tiempos de incubación.

En la Fig. 18 se observa que existe una relación prácticamente lineal entre la actividad específica y el tiempo de incubación hasta los 75 min. Luego se curva, no variando la actividad específica con el tiempo de incubación después de los 115 min. Se elige como tiempo de incubación para los siguientes experimentos 60 min.

1.b₃ Determinación de la concentración de PBG y de proteínas enzimáticas "PBG-asa" en el medio de incubación.

Se probaron concentraciones de PBG entre 2×10^{-3} mM y 42×10^{-3} mM en el medio de incubación.

La actividad específica de la enzima (Fig. 19) va creciendo hasta una concentración de 20×10^{-3} mM de PBG. A concentraciones

Fig. 18

CURSO DE LA REACCION DE LA 'PBG-ASA' EN RELACION AL TIEMPO DE INCUBACION.

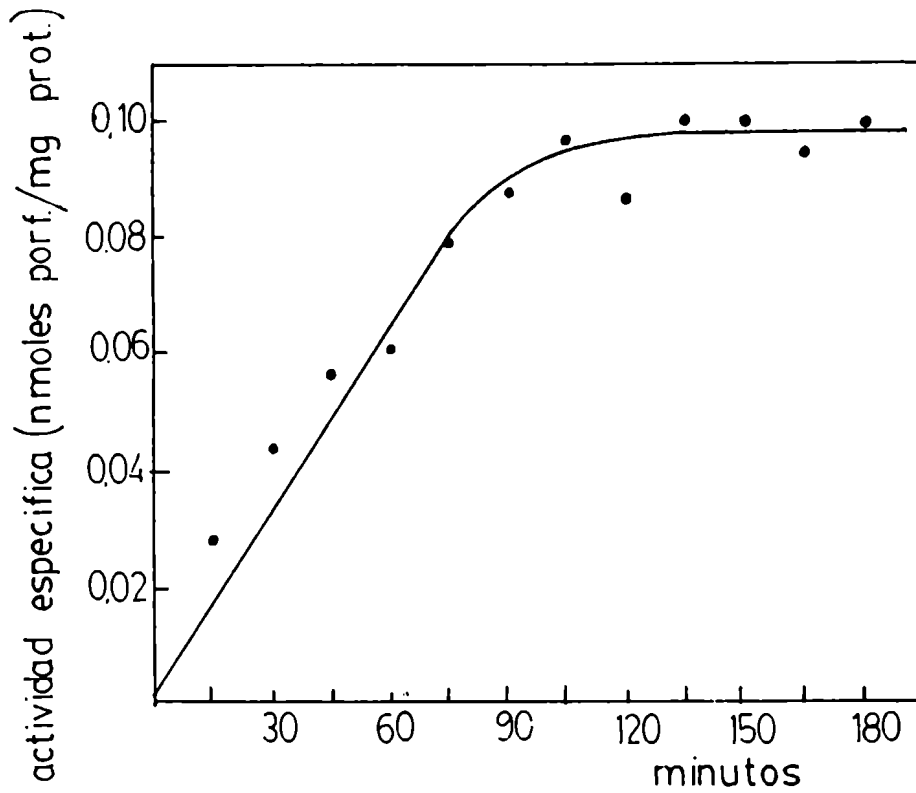
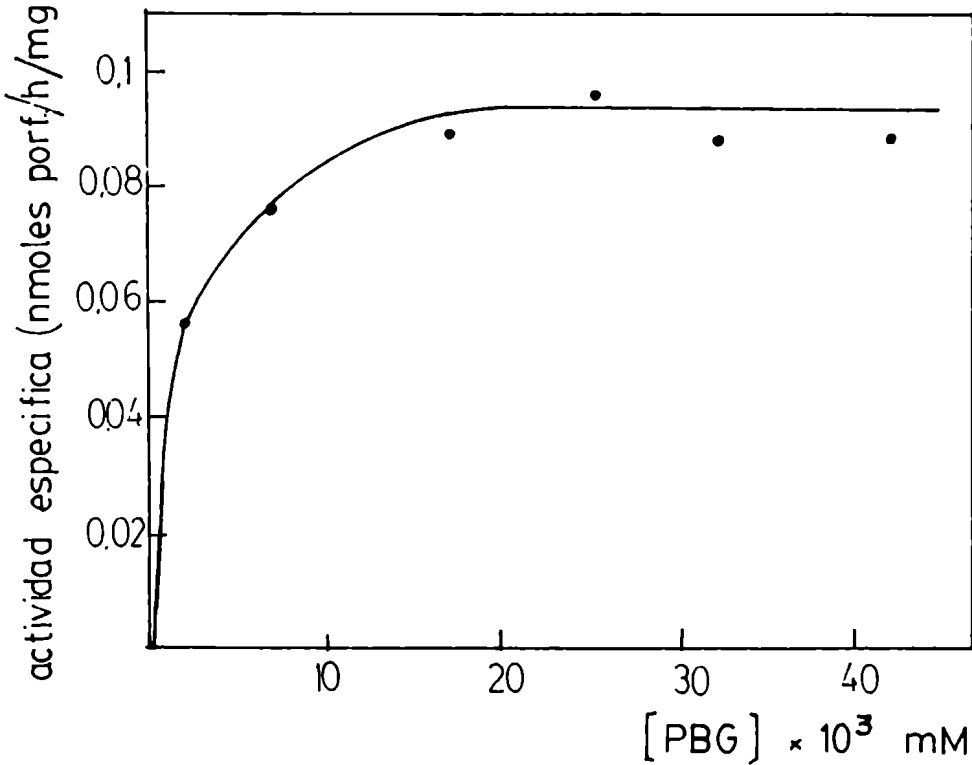


Fig. 19

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE PBG SOBRE LA ACTIVIDAD DE PBG-ASA.



mayores la actividad permanece constante con lo cual se considera que se está a saturación.

En los posteriores experimentos se trabajará con concentraciones de aproximadamente 25×10^{-3} mM en el medio de incubación.

En la Fig. 20 se observa que los nmoles de porfirinas formadas es proporcional a los mg de proteínas incubadas en todo el rango de proteínas ensayado que abarcó desde 4 mg hasta 25 mg.

1.b. 4. Determinación del pH óptimo de incubación.

La curva de pH se determinó con buffer $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$ desde pH 7.1 hasta pH 8.3. Desde pH 8.3 hasta pH 9 se determinó con buffer Tris-ClH en el medio de incubación, así se determinó (Fig. 21) que la máxima actividad de la enzima se hallaba entre pH 8 y pH 8.5.

1.b.5. Efecto de los cationes Na^+ y Mg^{++} sobre la actividad de "PBG-asa".

Se investigó el efecto del agregado de Na^+ y Mg^{++} dado que se ha informado que dichos cationes aumentan la actividad de PBG-asa de hígado de vaca (178) y de callos de soya (179). Para la enzima de hígado de rata observamos que al agregar al medio de incubación Na^+ (Fig. 22) en una concentración 40 mM no varía la actividad de "PBG-asa". Al adicionar una concentración de Na^+ de 120 mM hay un muy pequeño aumento de actividad que alcanza apenas a un 4%. Para todas las demás concentraciones de Na^+ hay decremento de actividad. Con la adición de Mg^{++} (Fig. 23) al medio de incubación hay siempre decremento de la actividad enzimática para todas las concentraciones ensayadas que varían entre 50 - 450 mM.

Fig. 20 ACTIVIDAD DE PBG-ASA EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS.

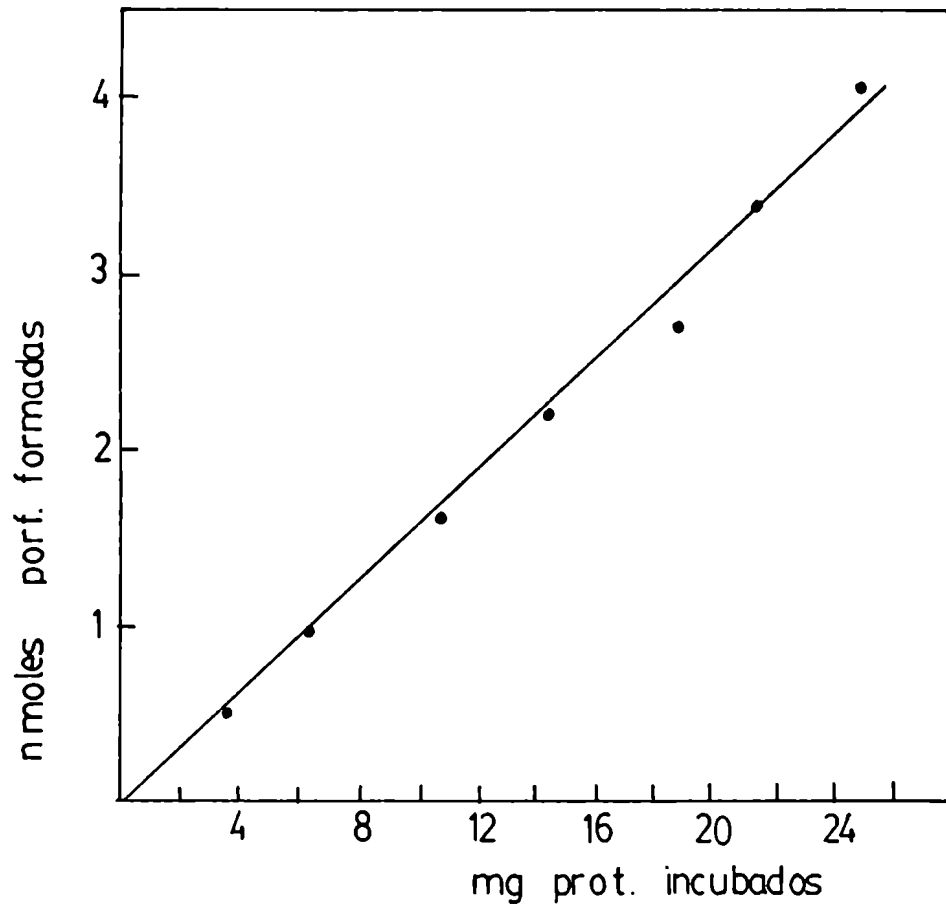
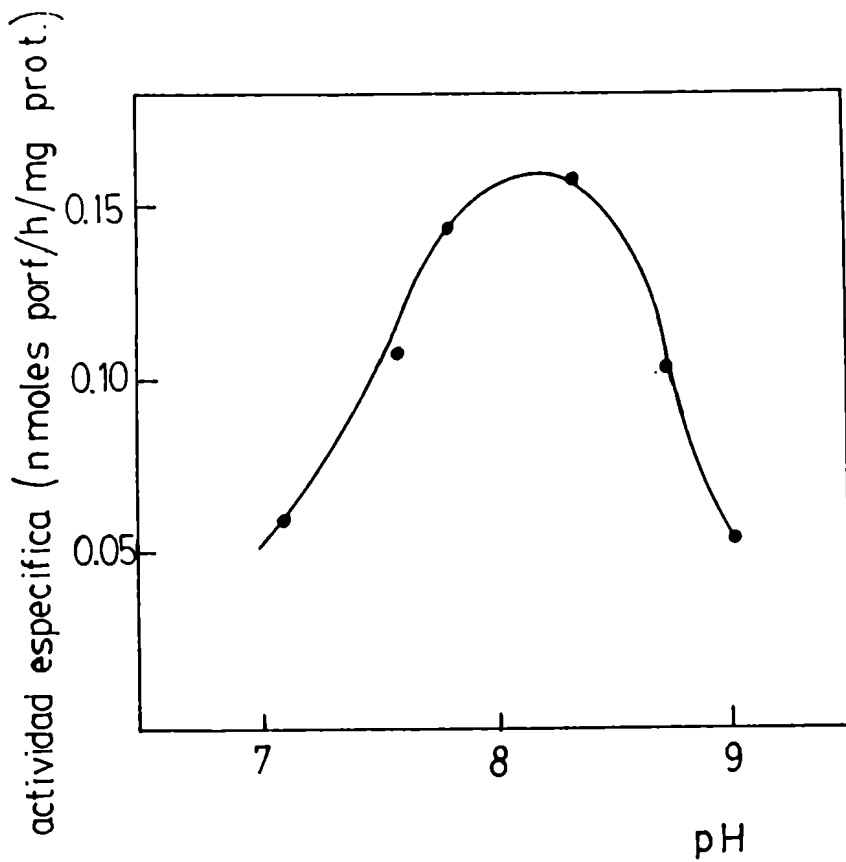
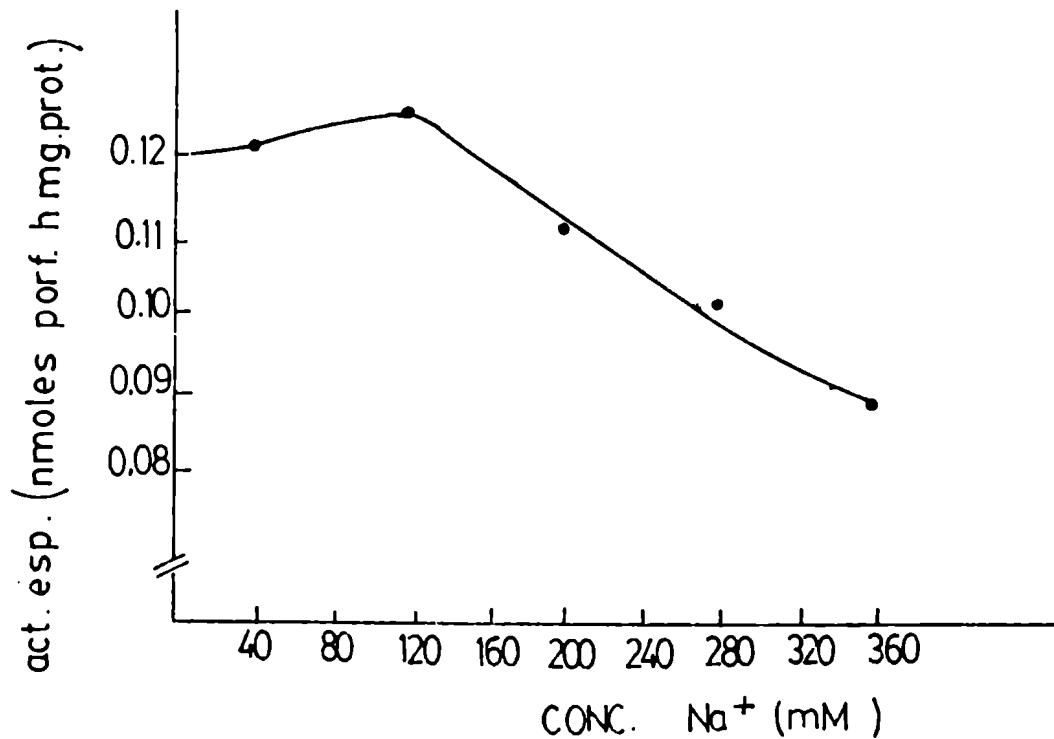


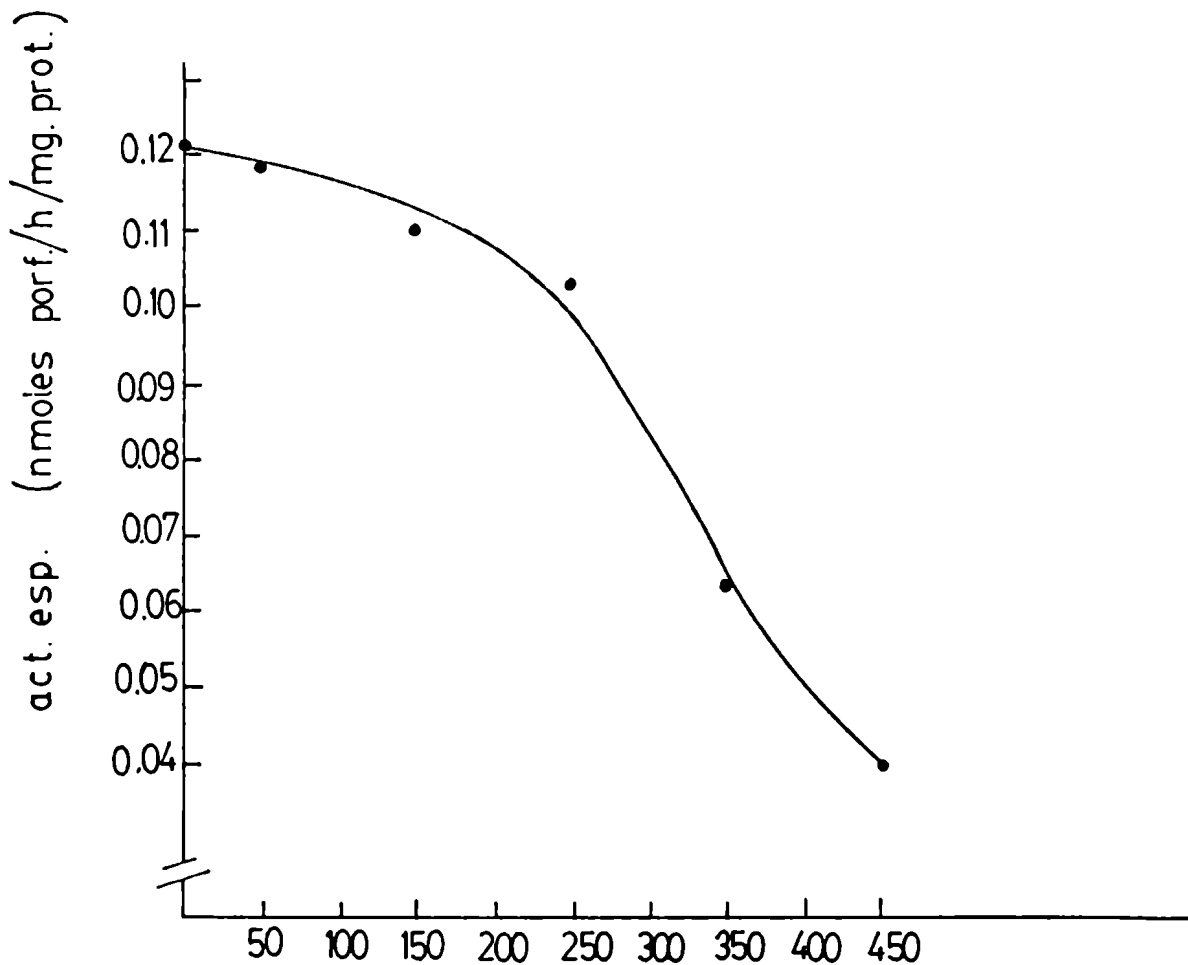
Fig. 21 CURVA DE pH DE INCUBACION PARA "PBG-ASA"





La homogeneización e incubación se realiza como en la Fig. 18. Se agregan distintos volúmenes de ClNa 2M obteniéndose las concentraciones detalladas en el gráfico.

Fig. 23 EFECTO DEL AGREGADO DE Mg^{++} AL MEDIO DE INCUBACION



La homogeneización e incubación se realiza como en la Fig. 18. Se agregan distintos volúmenes de Cl_2Mg 0.25M obteniéndose las concentraciones que se detallan en el gráfico.

Cuando se adicionan ambos cationes conjuntamente al medio de incubación (Fig. 24) se observa un muy pequeño aumento de actividad con una concentración de Na^+ de 120 mM a pesar de tener una concentración de Mg^{++} de 150 mM. Para concentraciones más elevadas decrece siempre la actividad enzimática.

Se quiso investigar la naturaleza de las porfirinas formadas con la adición de dichos cationes y sin la adición de los mismos. Para ello se realizaron las correspondientes cromatografías en papel según Cornford y Benson (167) con la adición de los cationes y sin la adición de los mismos. En la Tabla III, se observa que la adición de Na^+ (200 mM) aumenta la proporción de Uro III, no detectándose Copro, ni Penta ni Hexa y disminuyendo la proporción de Firia. Esta concentración de Na^+ inhibiría la actividad de Uro-D pero habíamos visto (Fig. 22) que disminuía también la actividad de la PBG-asa.

La adición de Mg^{++} (Tabla III) aumenta un poco la proporción de Uro I a expensas de Uro III y Firia, no habiendo prácticamente variación de los demás intermediarios. Con la adición de Na^+ y Mg^{++} aumenta la proporción de Uro I y Uro III a expensas de los demás intermediarios, no detectándose Copro ni Penta ni Hexa y una proporción muy pequeña de Firia.

Conclusiones.

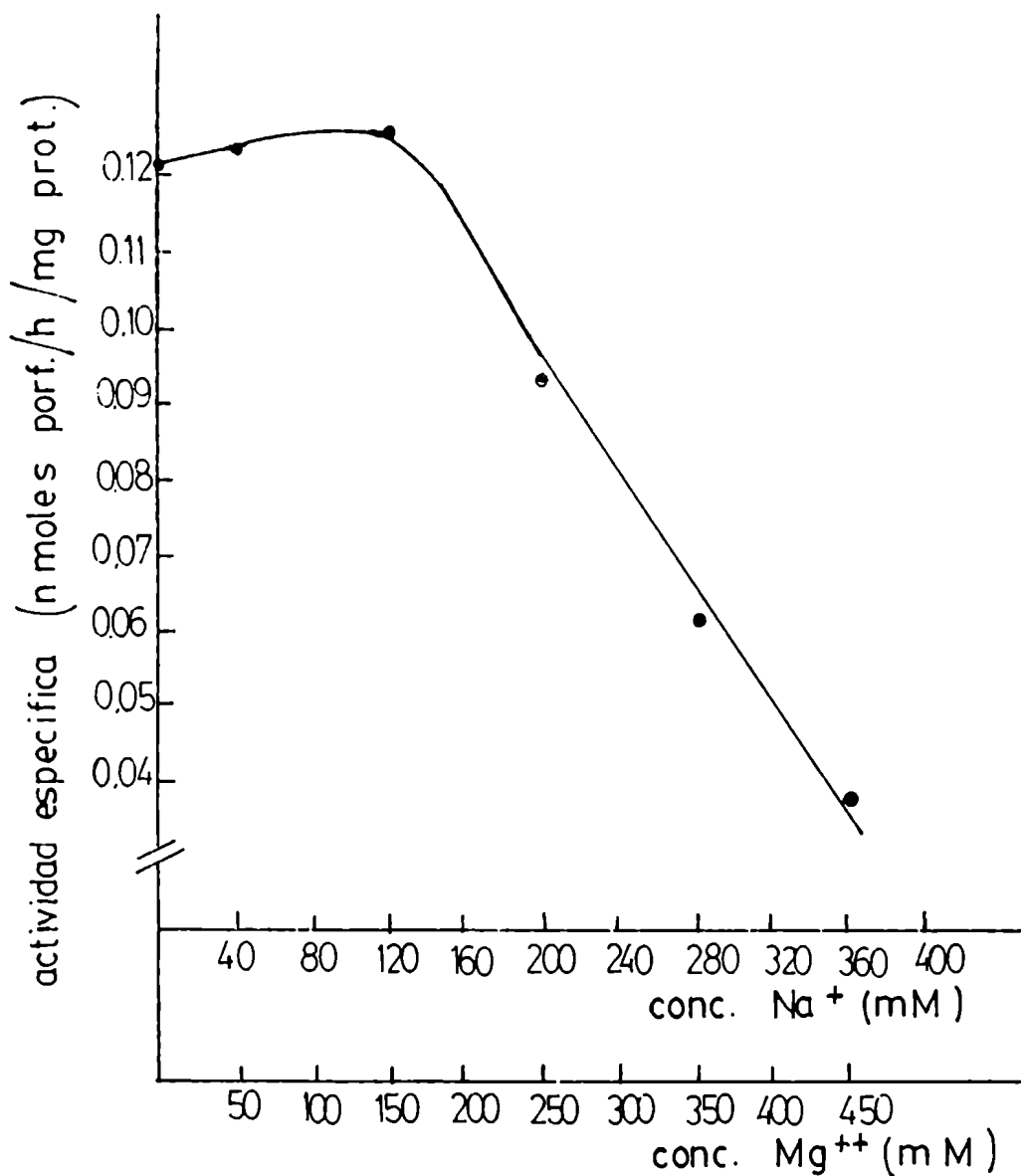
Para determinar actividad de PBG-asa en hígado de rata se extrajo el mismo, se lavó con solución fisiológica, se secó con papel de filtro,

TABLA III. EFECTO DEL AGREGADO DE Na Y Mg EN LA NATURALEZA DE PORFIRINAS PRODUCIDAS POR PBG-ASA DE HIGADO NORMAL.

SOBRENADANTE DE 11000 G DE HIGADO NORMAL	AGREGADO	NATURALEZA DE PORFIRINAS (%)					
		URO I	URO III	FIRIA	HEXA	PENTA	CORRO
H _N	---	5	43	29	3.5	3.5	15
H _N	NA (200 mM)	8	73	19	---	---	---
H _N	Mg (250 mM)	13	38	22	5	5	17
H _N	NA (200 mM)	36	56	8	---	---	---
	Mg (250 mM)						

Se incubó PBG-asa₊ de hígado de rata normal como se detalla en Métodos. En el medio de incubación se adicionó Na⁺ (200 mM); Mg⁺ (250mM); y la mezcla de ambos. Las porfirinas obtenidas se secaron, esterificaron y pasaron a Cl₃CH para realizar las cromatografías según el método de Cornford y Benson (167) y determinar la naturaleza de las porfirinas.

Fig. 24 EFECTO DEL AGREGADO DE Na^+ Y Mg^{++} AL MEDIO DE INCUBACION.



La mezcla de incubación se realiza como se detalla en Métodos. Se agrega ClNa y Cl_2Mg al mismo tubo en las concentraciones que se detallan en el gráfico.

se centrifugó a 11.000 g 20 min. y se homogeneizó con ClK 0.134 M en la proporción 1 g a 5 ml.

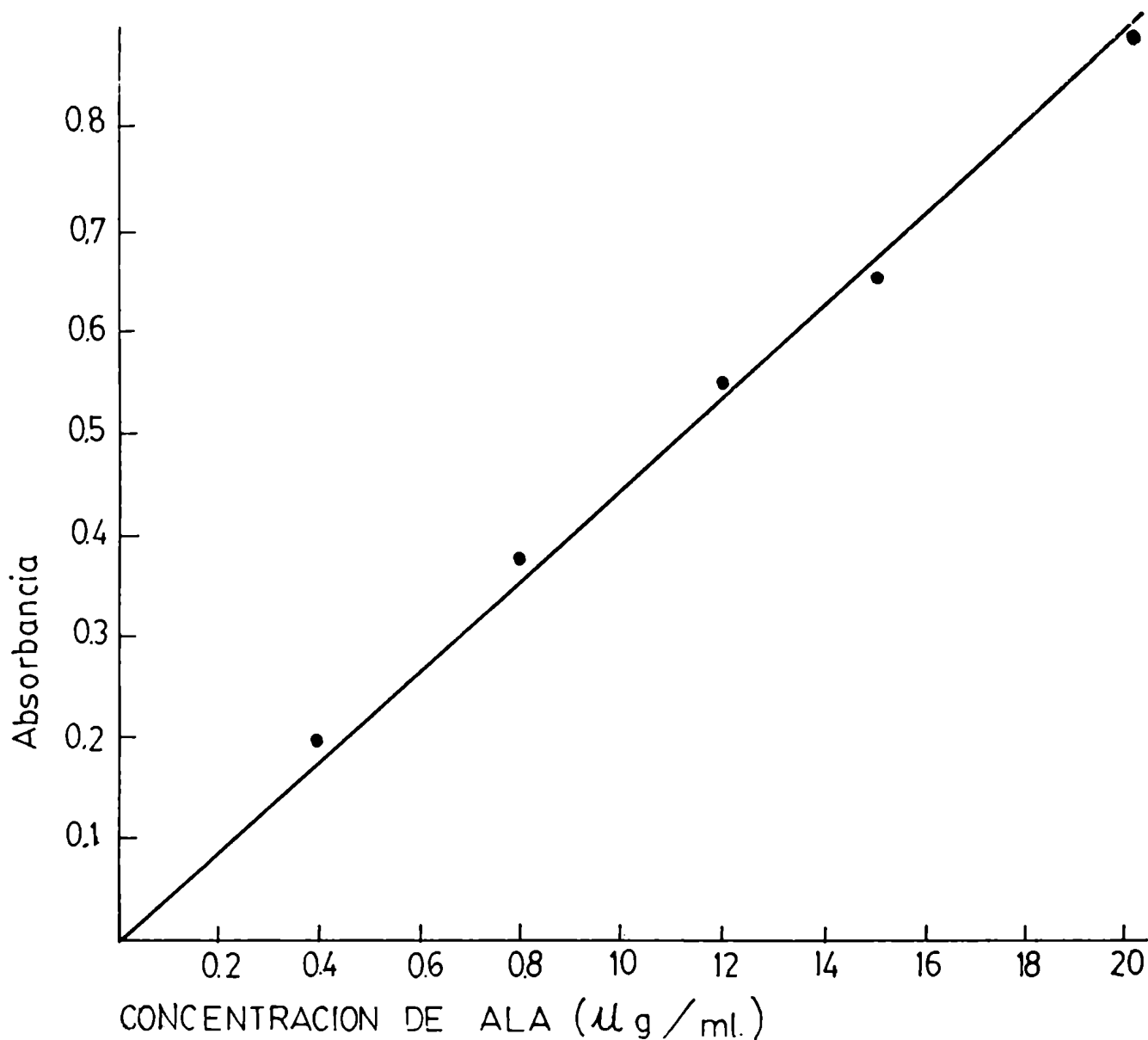
El tiempo de incubación fué de 60 min. La concentración de PBG en el medio de incubación fué entre 16×10^{-3} y 20×10^{-3} mM. Se incubaron de 10-14 mg de proteínas, a un pH 8.1. El volumen total de incubación fué de 2.5 ml. No se adicionó ni Na^+ ni Mg^{++} pues estos a concentraciones mayores que 120 mM para el primero y 150 mM para el segundo catión disminuían la actividad y para concentraciones menores no tenfa efecto significativo y por tanto se prefirió trabajar sin inhibidores presentes.

2. Utilización de columnas Dowex 1 y Dowex 50 y sus respectivos rendimientos en las determinaciones de ALA, PBG y porfirinas de orinas de ratas normales y tratadas con HCB.

2.a. Coefficiente de extinción para ALA convertido en 2-metil,3-acetil, 4 carboxietil pirrol (ALA pirrol).

Para realizar la curva de calibración para la determinación de ALA, se tomó una solución de ALA de concentración $2 \mu\text{g/ml}$. De esta solución se pipetaron distintas alícuotas, se agregó buffer acetato 1 M pH 4.6 hasta completar 2 ml y 0.05 ml de acetil acetona. Se agitó y calentó durante 10 min a 100°C en baño de agua. Se enfrió a temperatura ambiente y se agregó 2 ml de reactivo de Ehrlich modificado leyendose la absorbancia después de 15 min a 556 nm. La pendiente de la curva de calibración de la Fig. 25 es de $0.475 \text{ ml}/\mu\text{g cm}$.

Fig.25 CURVA DE CALIBRACION DE ALA CONVERTIDO EN 2-METIL 3-ACETIL 4-CARBOXIETIL PIRROL



La solución patrón de ALA contiene 2 µg/ml se agrega buffer acetato 1M hasta completar 2 ml y 0.05 ml de acetyl acetona. Se calienta 10 min a 100°C, se enfría a temperatura ambiente y se agrega 2 ml de reactivo de Ehrlich modificado como se detalla en Métodos. Se lee la absorbancia a 556 nm.

Este valor multiplicado por el PM de ALA da el coeficiente de extinción molar

$$E_M = \text{pendiente} \times \text{PM}_{\text{ALA}}$$
$$E_M = 0.475 \frac{1}{\mu\text{g cm}} \times 131 \times 10^6 \mu\text{g} \times 10^{-3}$$
$$E_M = 6.2 \times 10^4$$

El coeficiente de extinción molar obtenido por Mauzerall y Granick fué de :

$$E_M = 6.6 \times 10^4$$

2.b. Estudio de las recuperaciones en las columnas de Dowex 1 y Dowex 50.

2.b.₁. Recuperación de PBG.

Se siguió la técnica descrita en Métodos, Se utilizó una solución de PBG de 206 nmoles/ml. Se sembró 1 ml de esta solución en sendas columnas de Dowex 1, Se estudió también la recuperación de PBG sembrandolo disuelto en orina normal. En 1 ml de orina normal se disolvieron 199 nmoles de PBG. En la Tabla IV se puede observar que el porcentaje de recuperación de PBG en columna Dowex 1 es de alrededor de 90% ya sea que se siembre disuelto en agua o en orina normal.

2.b.₂. Recuperación de ALA.

Se siguió la técnica descrita en Métodos. Para determinar la recuperación de ALA se añadió a 0.13 ml de buffer en el cual había disueltos 101,5 nmoles, 0.86 ml de orina normal (Tabla V líneas 3 y 4). En este volumen de orina normal había 20.9 nmoles de ALA ya que se vió que la concentración de ALA en esa orina era de 24.2 nmoles/ml. La cantidad total de ALA agregada a la columna

TABLA IV: RECUPERACION DE PBG EN COLUMNA DOWEX 1.

COLUMNA	NMOLES PBG SEBRADOS	H ₂ O	ORINA NORMAL	NMOLES DE RECUPERADOS	% DE RECUPERACION
1	206	1	-	187	91%
2	206	1	-	179	87%
3	-	-	1	4	-
4	199	-	1	184	91%
5	199	-	1	184	91%

- 100 -

TABLA V. RECUPERACION DE ALA EN COLUMNA DOWEX 50.

COLUMNA	NMOLES DE ALA SEMBRADOS.	BUFFER ACETATO PH 4.6 (ML)	ORINA NORMAL (ML)	NMOLES ALA RECUPERADOS	% DE RECUPERACION
1	105	1	-	102	97%
2	103	1	-	102	99%
3	-	-	1	24.2	-
4	101.5	0.13	0.86	121	99%

Dowex-50 fué por lo tanto de 122 nmoles. Como se recuperaron 121, el % de recuperación fué de 99%. Cuando se agregó a la columna ALA disuelta en buffer acetato se encontró también un % de recuperación entre 97-99%.(Tabla V líneas 1 y 2).

2.b. . Recuperación de porfirinas,
3

Para el estudio de recuperación de porfirinas se sembró la muestra en la columna Dowex 1. Se agregaron los reactivos para eluir ALA yPBG como se detalla en Métodos. Luego se eluyeron las porfirinas de cada una de las columnas con ClH 5% y con ClH 10% hasta fluorescencia negativa. La elución se realizó finalmente en los experimentos con ClH 10% pues ésta era mucho más rápida que con ClH 5%. En la Tabla VI se observa que el porcentaje de recuperación es de alrededor del 90%. Este porcentaje no varía con la cantidad de μg de porfirinas sembradas. Se sembró en la columna 2 una pequeña cantidad de porfirinas que correspondería a una rata normal; en la columna 3 una cantidad mayor que correspondería a un animal levemente porfírico; y en la columna 4 una cantidad correspondiente a un animal muy porfírico. Es de hacer notar que se siembra en este caso una cantidad de orina entre 0.5 y 1 ml y que la diuresis es de 6 a 8 ml con lo cual aumentan los μg de porfirinas totales excretados.

Para realizar los cálculos se tomó un coeficiente medio en ClH considerando que en la muestra existe 25% de Copro, 30% de Fia y 45% de Uro, determinado por cromatografía.

TABLA VI. RECUPERACION DE PORFIRINAS EN COLUMNAS DOWEX 1.

COLUMNA	µg PORFIRINAS SEMBRADOS	H ₂ O (ML)	ORINA NORMAL (ML)	µg PORFIRINAS RECUPERADOS	% DE RECUPERACION
1	-	-	0.5	0.12	-
2	1	0.01	1	0.91	91
3	3.37	0.01	0.5	3.10	92
4	50.5	0.15	1	45.4	90

Las porfirinas fueron pipeteadas a partir de una solución patrón preparada en solución acuosa en una concentración de 337.04 µg/ml.

coeficiente en ClH 5% para Copro : 1,726.

coeficiente en ClH 5% para Firia : 1.637.

coeficiente en ClH 5% para Uro : 1.892.

Multiplicando cada uno de los coeficientes por su correspondiente porcentaje en la mezcla se obtiene un coeficiente medio

$$K_{1/2} = 1.774 \mu\text{g}/\text{ml}.$$

Las columnas se eluyeron con ClH 10% para determinar el contenido en porfirinas de las orinas. Para leer en el espectrofotómetro se realizó una dilución con agua destilada para que la mezcla de porfirinas eluída de la columna Dowex 1 se halle disuelta en una solución de ClH 5%. Se realizó esto debido a que no se disponen de los coeficientes en ClH 10%.

3. Efectos del tratamiento de las ratas con HCB durante períodos cortos.

Se quiso provocar porfiria por administración de HCB a ratas en un corto tiempo.

Para ello se separaron 12 ratas en 4 lotes. Se les retiró el alimento durante 24 hs. y se dejó el agua de bebida durante todo el experimento. Después de este ayuno se les administró por inyección intraperitoneal HCB disuelto en aceite o propilenglicol y a los animales control sólo el vehículo. Los animales estaban divididos por lo tanto en la siguiente forma: lote 1: administración de aceite; lote 2: administración de HCB disuelto en aceite; lote 3: administración de propilenglicol; lote 4: administración de HCB disuelto en propilenglicol. Cada ani-

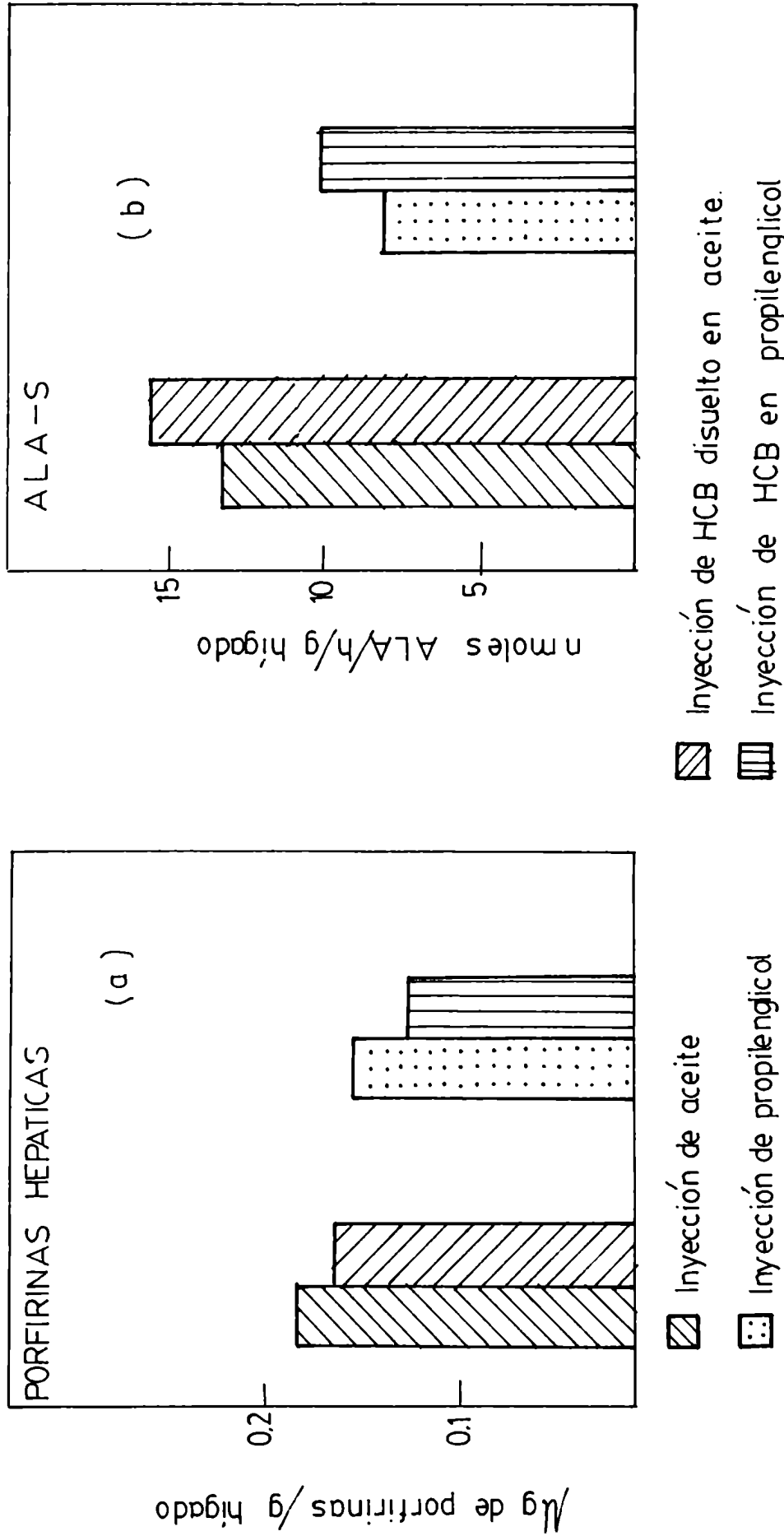
mal recibió 4 inyecciones separadas una de la otra 12 hs, recibiendo cada vez una dosis de 100 mg de HCB disueltos en 2 ml de aceite o en 1 ml de propilenglicol. Los animales control recibieron 2 o 1 ml del vehículo correspondiente.

Después de 24 hs de ayuno y 48 hs de tratamiento con HCB, los animales fueron sacrificados, se extrajeron los hígados y se determinó contenido en porfirinas, actividad de ALA-S y de Uro-D como se detalla en Métodos.

En la Fig. 26 (a) se muestra el contenido de porfirinas hepáticas para los distintos lotes de animales. En la Fig. 26 (b) la actividad de ALA-S; y en la Fig. 27 la actividad de Uro-D correspondiente a la 1a. y 2a. etapa. En la 1a. etapa se mide la formación de Fia + Hexa + Penta + Copro ; y en la 2a. etapa se mide la formación de Copro.

Se puede ver que no hay diferencias significativas entre los animales que recibieron HCB y los que recibieron sólo el vehículo en ninguno de los parámetros medidos (Fig. 26(a); 26 (b) y 27), ya que los valores normales para porfirinas oscilan entre 0.1 y 0.2 ug de porfirinas/g hígado y la actividad enzimática para ALA-S entre 7 y 18 nmoles de ALA/h/g de hígado. Por lo tanto, se concluye que no se pudo provocar disturbios en el metabolismo de porfirinas por administración de HCB en un período de 48 hs y 72 hs de ayuno continuo.

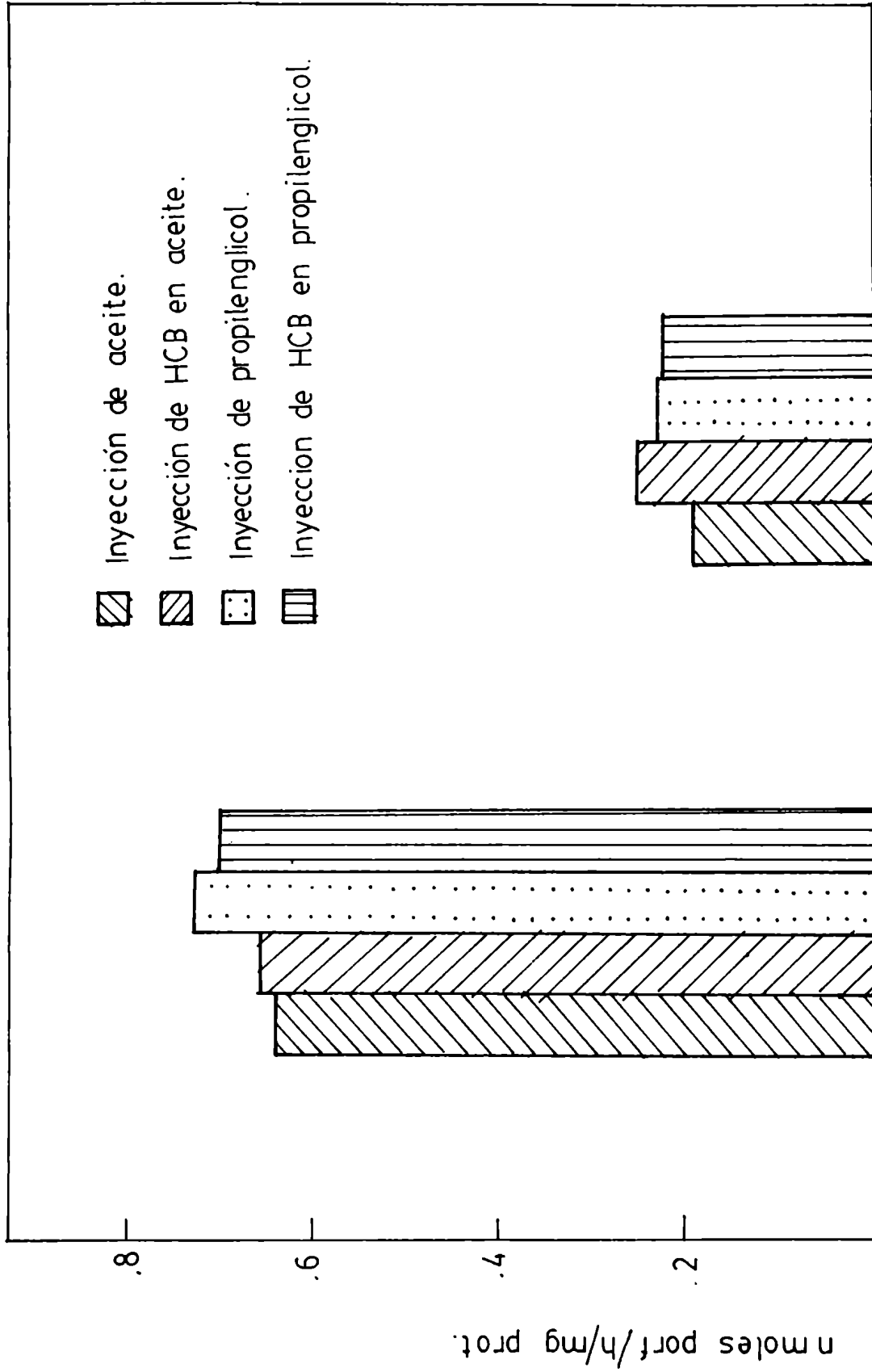
Fig. 26



Las porfirinas hepáticas (Fig.26(a)) se determinan como se detalla en Métodos, sobre alícuotas de 1ml de homogenato. Se determina ALA-S(Fig.26(b)) utilizando para homogeneizar ClNa 0.9%, EDTA 0.5mM, Tris ClH 10mM pH 7.4 en la reacción 1a.3.La mezcla de incubación contiene glicina 0.1M,EDTA 0.01M,Tris-ClH $8 \times 10^{-2}M$ y 0.5ml de preparación enzimática. La determinación colorimétrica se describe en Métodos.Cada animal recibe 4 inyecciones de 100mq de HCB disueltos en 1ml de propilenglicol o 2ml de aceite.Los controles reciben sólo el vehículo correspondiente.

Fig. 27

ACTIVIDAD DE URO-D



(F+H+P+C)

C

Se homogeneiza en CLK 0.134M. La mezcla de incubación contiene buffer PO_4H_2K/PO_4HK_2 0.067M pH 7.0, GSH $10^{-3}M$, EDTA $10^{-4}M$, Uro'gen III 2UM y 0.3ml de sobrenadante de homogenato de 11000g, en un volumen final de 3ml. La cantidad de proteínas incubada es entre 7 y 10mg. Las dosis de HCB administradas son como en la Fig. 27.

II, EXPERIMENTOS PARA ELUCIDAR SI EL HCB PRODUCE
PORFIRIA "PER SE" O A TRAVES DE UN METABOLITO.

1. Efectos del FB, del HCB y de ambos compuestos, administrados a ratas Wistar normales.

Este estudio se realizó para investigar si el HCB o un metabolito ejerce su acción sobre las actividades de las enzimas del camino del hemo. Se sabe que el FB estimula el metabolismo microsomal de drogas (138) y por lo tanto la administración de este compuesto debería acelerar la metabolización del HCB.

1.a. Condiciones experimentales.

Se utilizaron ratas hembras Wistar de aproximadamente 180 g de peso. Se las dividió en 4 lotes de 15 animales cada uno. El lote 1 correspondía a ratas normales (N) ; el lote 2 a ratas tratadas con FB; el lote 3 a las tratadas con HCB y el lote 4 a las tratadas con FB + HCB.

El FB fué administrado en el agua de bebida en una concentración de 1 g/l.

El HCB fué administrado diariamente por sonda gástrica en una concentración de 1 g/kg de peso de animal.

Los animales comenzaron a ingerir FB 1 semana antes de comenzar la intoxicación con HCB tanto para el lote FB como para el lote FB + HCB.

Las ratas se colocaron en jaulas metabólicas y se mantuvieron durante 3 meses en estas condiciones experimentales de drogado. Diariamente se recogía la orina de los animales de los 4 lotes y se realizaban las determinaciones de ALA, PBG y porfirinas como se

detalla en Métodos. En cada experimentos se sacrificaron 12 animales, 3 de cada lote a la 1a., 3a., 5a., 8a. y 11a. semana considerando como iniciación del experimento el día de comenzar a drogar con HCB.

Una vez sacrificado el animal con una guillotina, se pesaba en su totalidad, se extraía rápidamente el hígado, el cual se colocaba en solución fisiológica fría, se secaba con papel de filtro y se pesaba, 1 g de dicho órgano se homogeneizaba para determinar actividad de ALA-S como se detalla en Métodos, El resto se homogeneizaba con ClK 0.154 M para determinar contenido de porfirinas, las enzimas ALA-D, PBG-asa, Uro-D, ferroquelatasa y concentración de citocromo P-450.

La forma de determinar contenido de porfirinas y actividad de ALA-S, ALA-D, PBG-asa y Uro-D se halla detallada en Métodos.

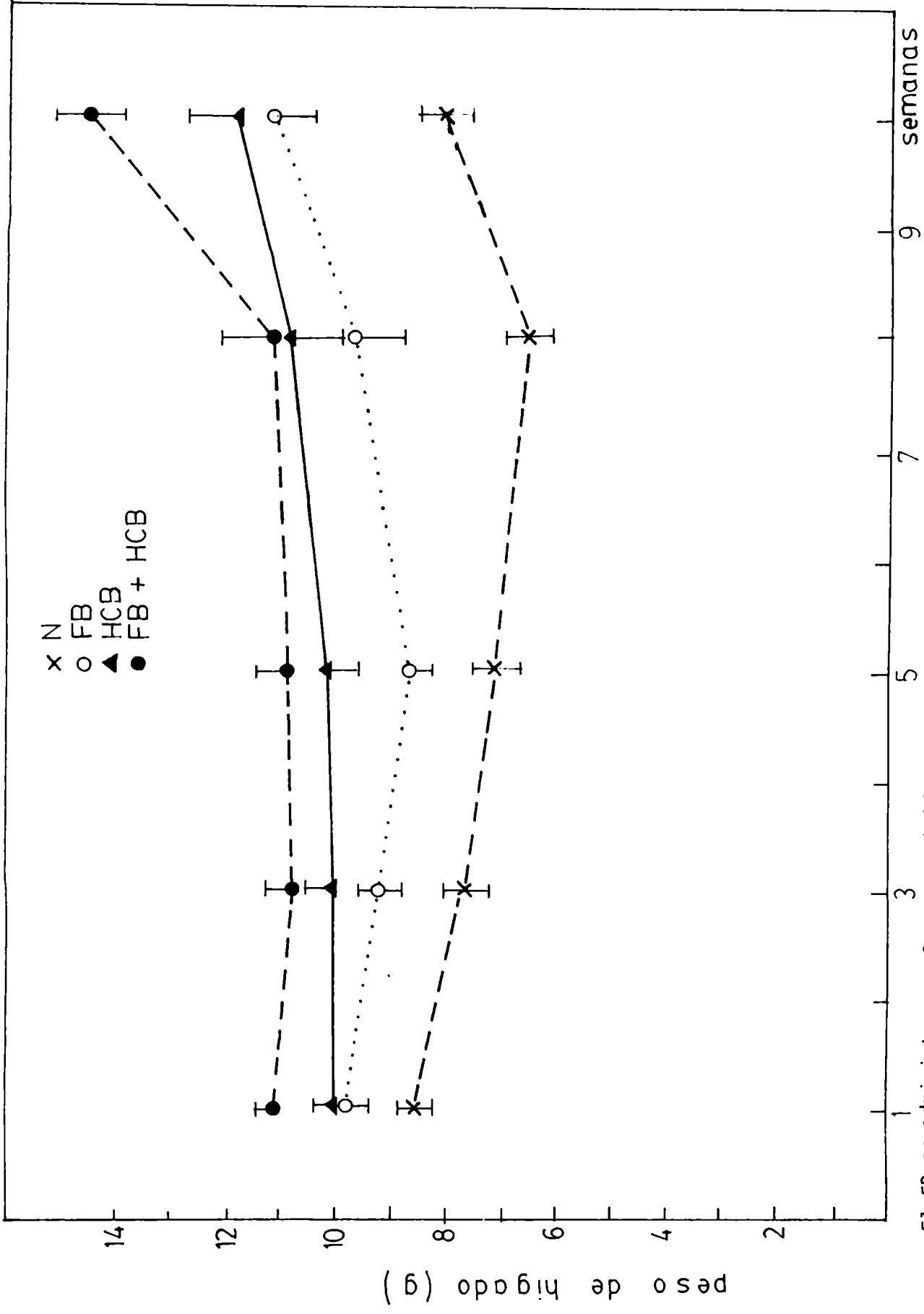
Para determinar PBG-asa y Uro-D los sobrenadantes de 11,000xg de homogenatos de hígados porfíricos fueron pasados a través de columnas de Sephadex G-25 para eliminar las porfirinas endógenas.

Este experimento se repitió en las mismas condiciones, o sea que cada valor de contenido de porfirinas en hígado o de actividad enzimática representa el promedio de 6 animales.

1.b. Relación entre el peso del hígado y el peso del cuerpo.

En la Fig. 28 se observa el efecto que tiene el FB, el HCB y ambas drogas sobre el peso del hígado en función de las semanas de tratamiento. Del análisis de la Fig. 28 surge que los hígados de ratas tratadas con FB son más grandes que los de las normales; los

Fig. 28 EFECTO DEL FB Y HCB SOBRE EL PESO DEL HIGADO.



El FB se administra en el agua de bebida en una concentración de 1g/l. El HCB se administra diariamente por sonda gástrica en una concentración de 1g/kg de peso de animal. Cada punto representa el promedio de las determinaciones realizadas en 6 animales \pm el error standard (E.S.).

animales tratados con HCB presentan hígados más grandes que los tratados con FB sólo y los tratados con ambas drogas presentan hígados aún mayores que los demás lotes.

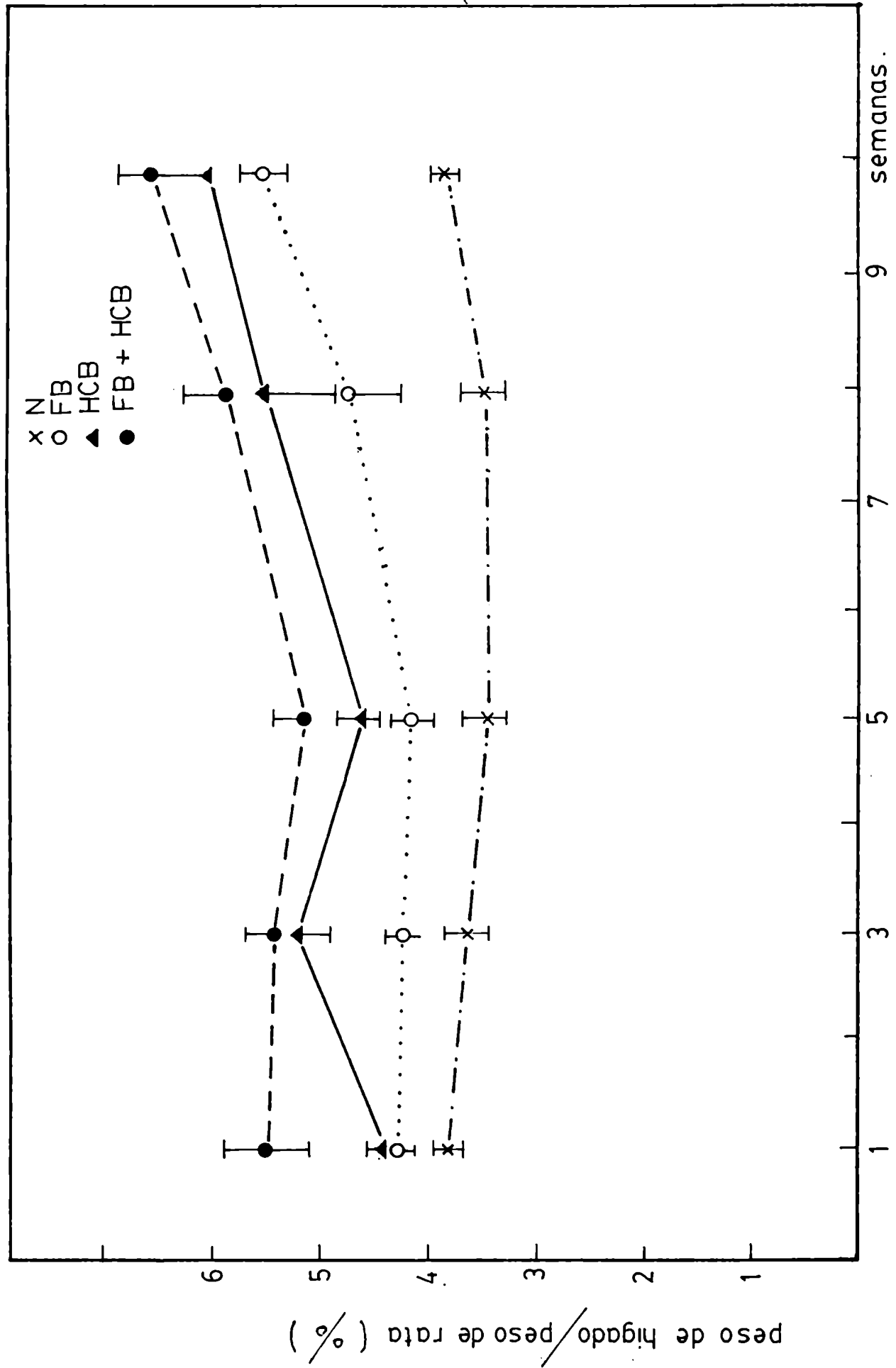
Los pesos de los hígados de cada uno de los lotes respecto al mismo lote se mantienen aproximadamente constantes hasta la 8a. semana. Se observa un aumento del peso de los hígados del lote FB, HCB y FB+ HCB entre la 8a. y 10a. semana de tratamiento. La disminución del peso de dicho órgano en los animales normales, se debe probablemente al uso de ratas más pequeñas ya que cuando se realiza la relación peso de hígado/peso de rata (Fig. 29) no se ve dicha disminución.

En la Fig. 29 se observa la relación entre el peso de hígado al peso de rata en función de las semanas de tratamiento. Desde la 1er. semana se observa que hay un incremento en el peso del hígado respecto al peso del cuerpo para las ratas intoxicadas respecto a las normales; siendo la relación más elevada para las tratadas con ambas drogas al mismo tiempo. El incremento es aproximadamente constante para los distintos lotes durante el experimento. El mayor incremento en el peso relativo se observa, para todas las semanas estudiadas, cuando se administran ambas drogas el mismo tiempo., observándose, igual que en la Fig. 28 un aumento de los hígados, respecto a su mismo lote entre la 8a. y 10a. semana.

1.c. Excreción urinaria de ALA, PBG y porfirinas y naturaleza de las porfirinas excretadas.

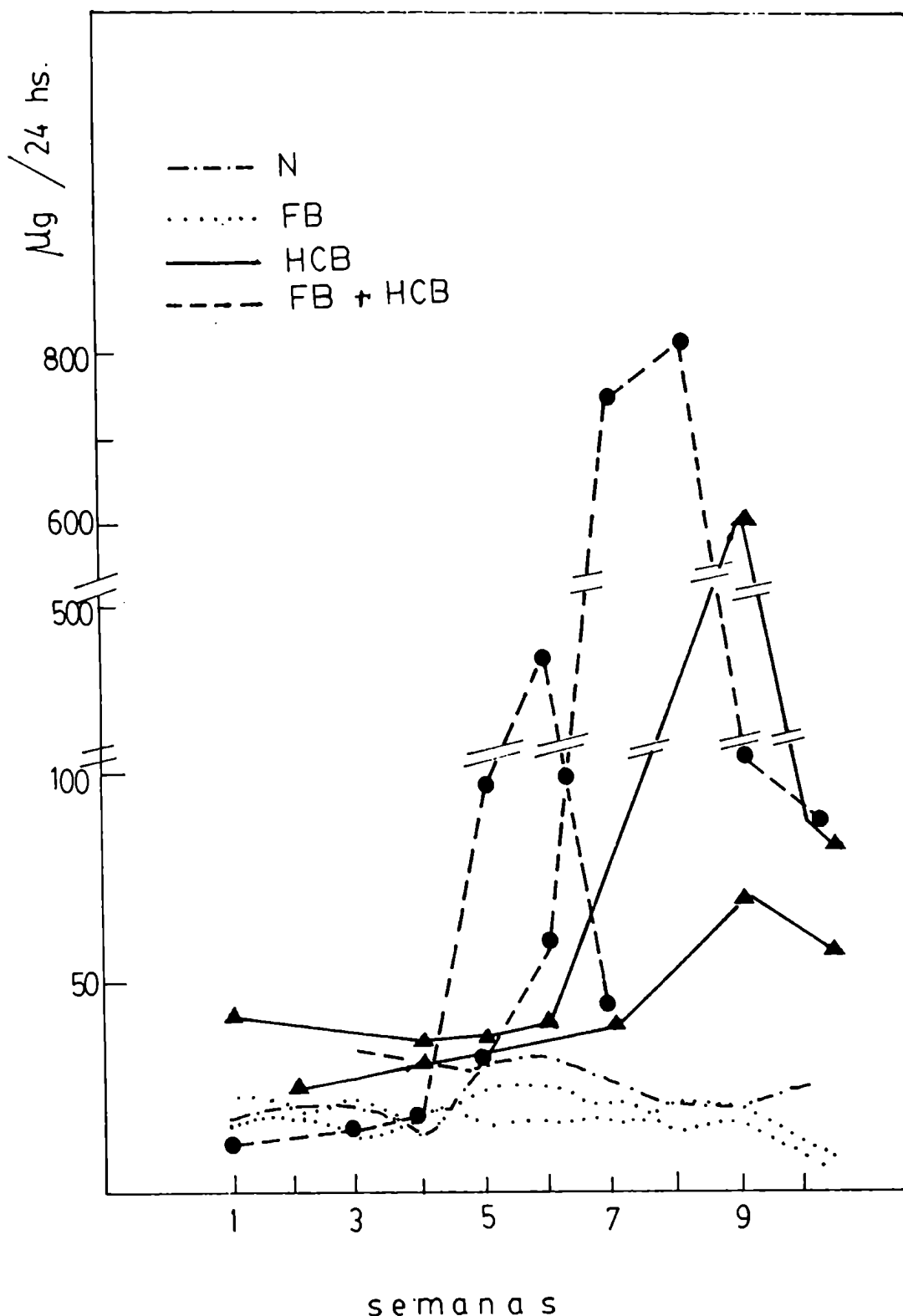
En la Fig. 30, 31, y 32 se observa la excreción urinaria de

Fig.29 EFECTO DEL FB Y HCB SOBRE LA RELACION ENTRE EL PESO DEL HIGADO Y EL PESO DEL CUERPO DE RATA.



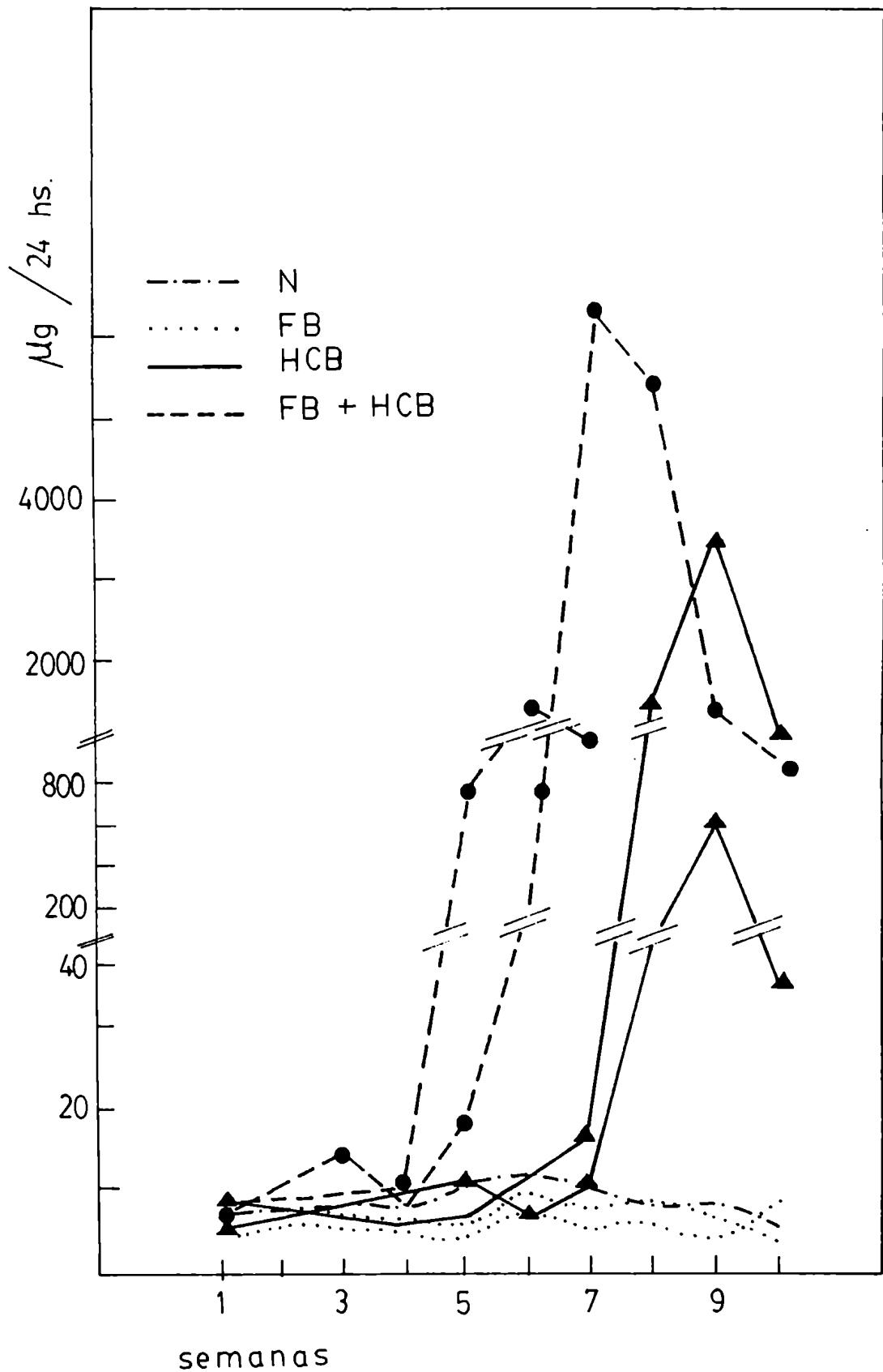
El FB y el HCB se administra de la misma forma que en la Fig. 28. Cada punto representa el promedio de las determinaciones realizadas en 6 animales \pm ES.

Fig. 30 EXCRECION URINARIA DE ALA



Se determina la excreción urinaria de ALA como se detalla en Métodos. En la columna Dowex 1 se siembran alícuotas de orina de 0.5ml para los animales que reciben HCB durante un tiempo superior a 4 semanas, o sea que sus excreciones superan ya a los normales (N). En el caso de animales N, drogados sólo con FB o con un tratamiento con HCB menor que 4 semanas se siembra 1ml de orina. En la Fig. se representan 2 ratas individuales y características de cada lote de animales drogados y el promedio de 5 animales para el lote normal.

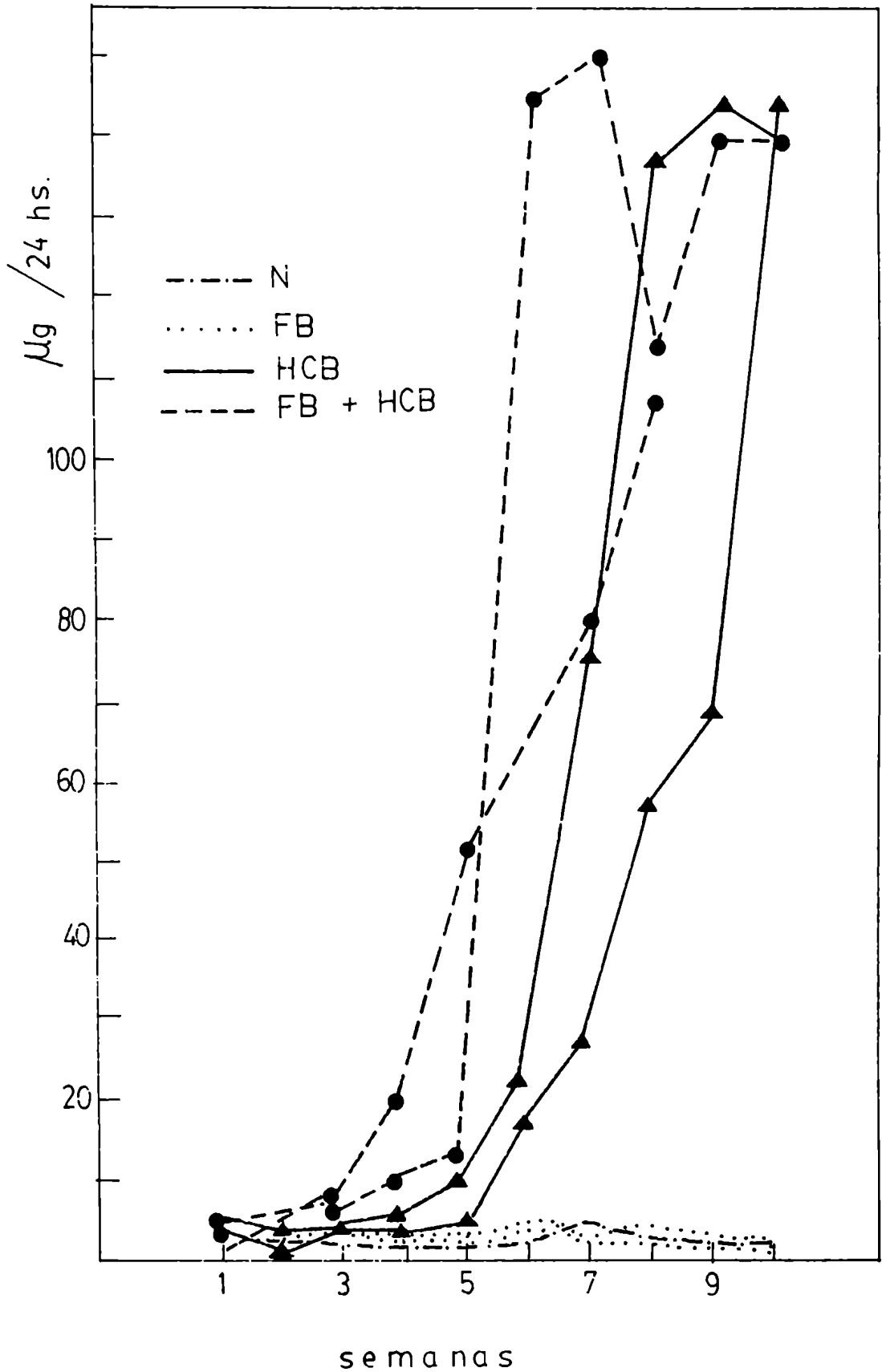
Fig. 31 EXCRECION URINARIA DE PBG



Se determina la excreción urinaria de PBG como se detalla en Métodos. Otras indicaciones y detalles como en la Fig. 30.

Fig.32

EXCRECIÓN URINARIA DE PORFIRINAS



Se determina la excreción urinaria de porfirinas como se detalla en Métodos. Otras indicaciones y detalles como en Fig. 30.

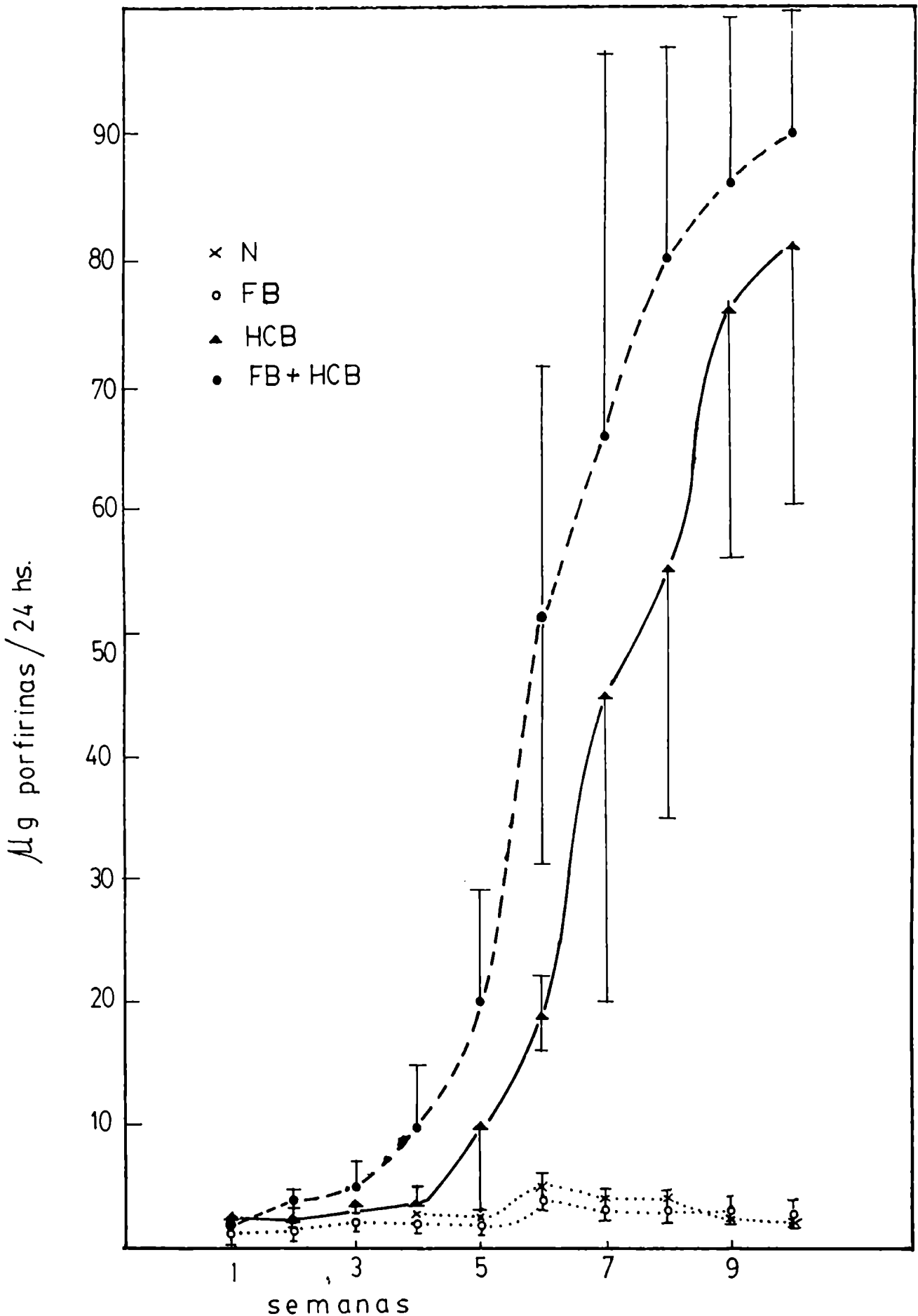
ALA, PBG y porfirinas en $\mu\text{g}/24\text{hs}$ en función de las semanas de tratamiento. Se graficaron 2 animales individuales y característicos para representar los lotes FB, HCB y FB + HCB. Se representó el promedio de valores normales para mayor claridad del gráfico, pues la variación entre 2 ratas normales es pequeña para poder visualizarlo gráficamente.

Se observa que los animales tratados con FB excretan ALA, PBG y porfirinas en cantidades normales. Los animales tratados con HCB aumentan la excreción de ALA, alcanzando valores de $600 \mu\text{g}/24\text{hs}$ o sea 40 veces los valores promedios normales ($19,1 \pm 5,1 \mu\text{g}/24 \text{hs}$), la excreción de PBG alcanza valores de $3500 \mu\text{g}/24 \text{hs}$ o sea aumenta alrededor de 400 veces respecto a los valores promedios normales ($4,4 \pm 0,5 \mu\text{g}/24 \text{hs}$) y la excreción de porfirinas alcanza a $145 \mu\text{g}/24\text{hs}$ o sea aumenta 58 veces respecto a los valores promedios normales ($0,7 \pm 0,1 \mu\text{g}/24 \text{hs}$), En la 5a. semana ya se observa un aumento respecto a los normales en ALA, PBG y porfirinas para el lote FB + HCB (porfirinas comienzan a aumentar a la 4a. semana) mientras que para el lote HCB este aumento recién se comienza a observar a la 7a. semana para ALA, entre 7a. y 8a. semana para PBG y a la 6a. semana para porfirinas. Los picos de excreción máxima de ALA y PBG para el lote FB + HCB se hallan entre la 6a. y 8a. semana mientras que para el lote HCB se hallan entre la 8a. y 10a. semana. Las excreciones máximas de porfirinas se alcanzan para el lote FB + HCB entre la 6a. y 7a. semana, mientras que para el lote HCB entre la 8a. y 10a. semana. En estas figuras observamos por lo tanto que las excreciones de

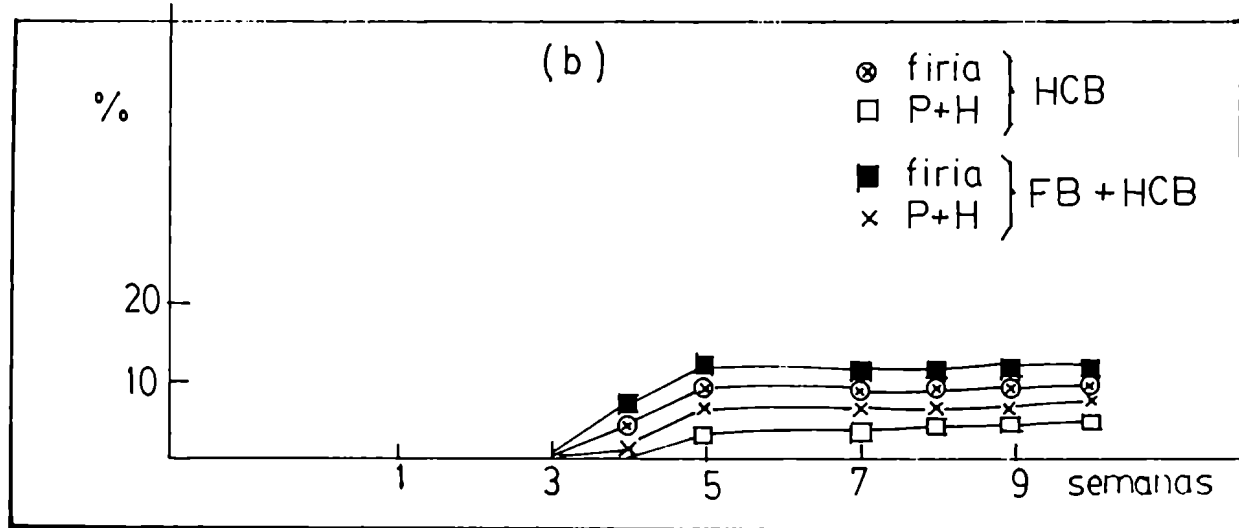
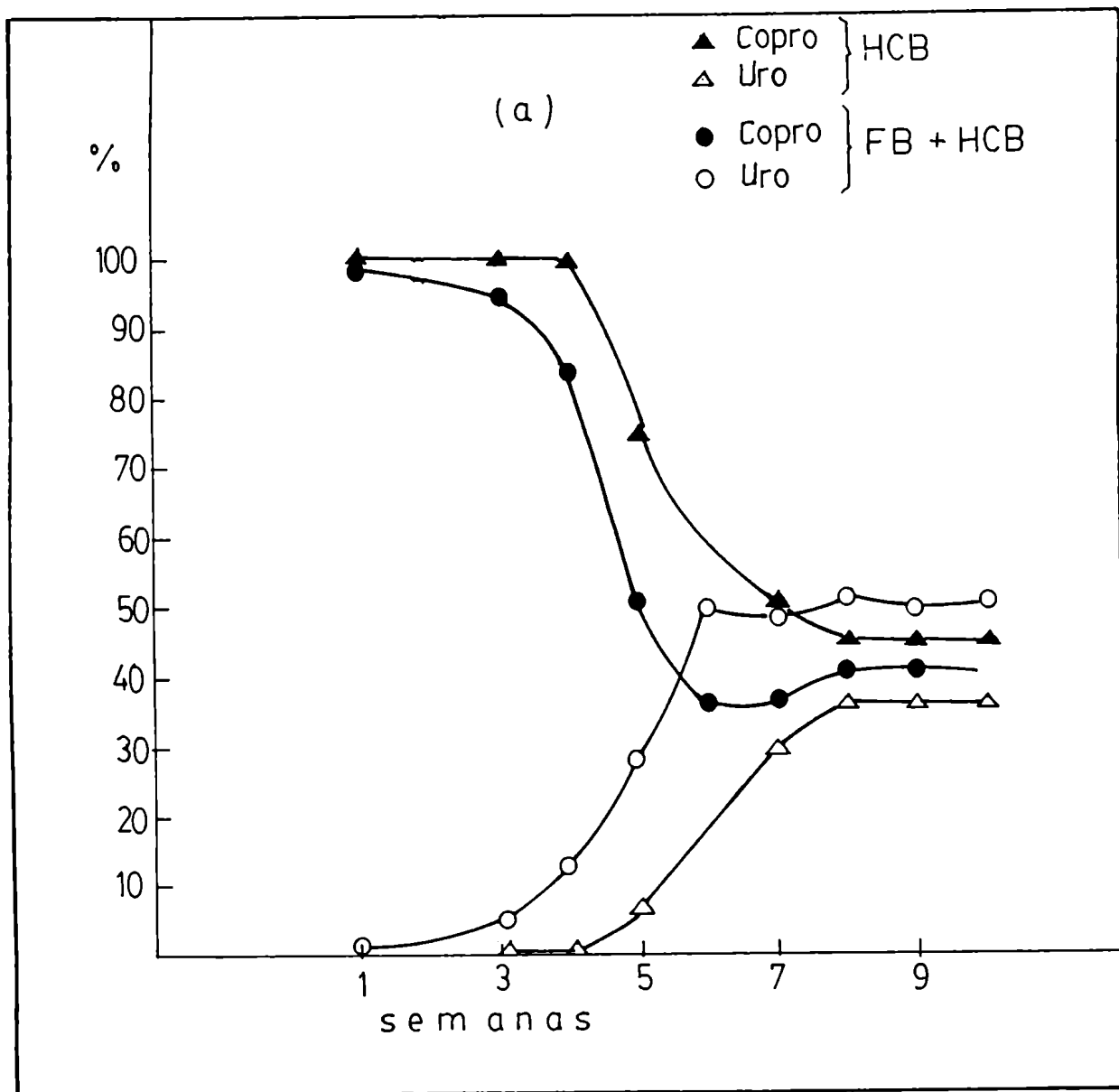
ALA, PBG y porfirinas para el lote FB + HCB preceden a las correspondientes del lote HCB.

En la Fig. 33 se observan los promedios de excreciones de porfirinas de todos los animales correspondientes a cada uno de los 4 lotes estudiados en función de las semanas de tratamiento. En la 4a. semana de tratamiento ya existe elevación de la excreción de porfirinas para el lote FB + HCB mientras que para el lote HCB recién se observa una elevación significativa a la 5a. semana. Mientras que los valores del lote drogado con FB sólo se mantienen en niveles normales, los promedios de los otros 2 lotes drogados aumentan constantemente observándose siempre un aumento mayor para el lote FB + HCB que para el drogado con HCB sólo, tendiendo a un valor constante a la semana 10,

En la Fig. 34 se observa la naturaleza de las porfirinas urinarias en función de las semanas de tratamiento para el lote HCB y FB + HCB, es decir para los lotes de animales que adquieren porfiria. Para el lote N y FB se vió en la Fig. 33 que la excreción de porfirinas es muy pequeña, determinándose sólo Copro. En la Fig. 34a se observa que en la 4a. semana para el lote HCB la porfirina excretada es sólo Copro, comenzando a decrecer éste recién a la 5a. semana con el aumento correspondiente de Uro, Firia y Penta + Hexa (Fig. 34 b). El lote FB + HCB ya a la 4a. semana presenta un decremento en la cantidad de Copro a expensas de Uro, Firia y Penta + Hexa (Figs. 34a y 34b), Constantemente a lo largo de las semanas de tratamiento hay una disminución mayor de Copro, a expensas de



La determinación de porfirinas urinarias se detalla en Métodos. Cada punto representa el promedio de las determinaciones de 6 a 8 animales \pm E.S.



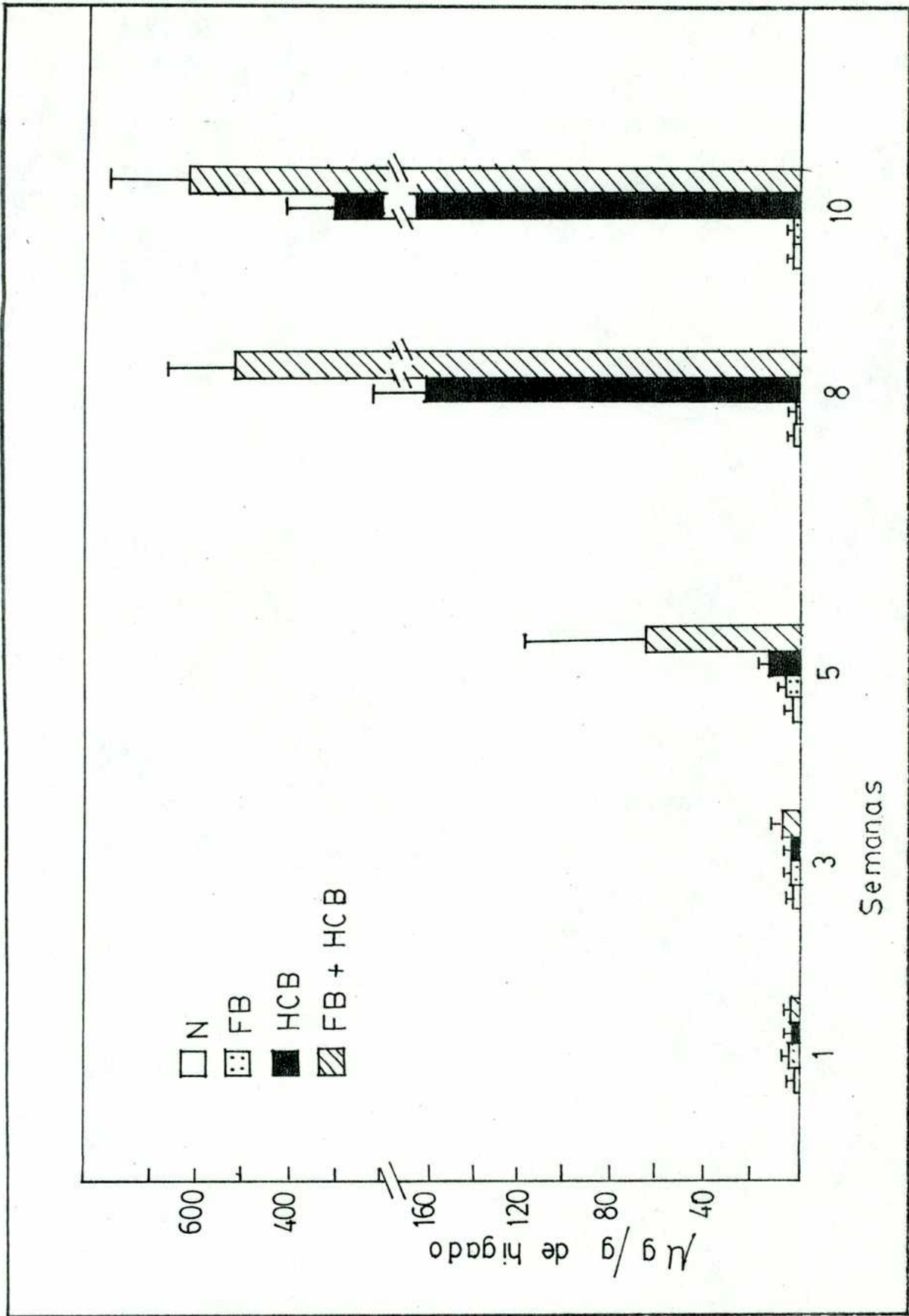
Se empleó el método de Falk y Benson (165) como se detalla en Métodos. La excreción de porfirinas con diferente número de carboxilos está expresada como porcentaje de las porfirinas totales excretadas. Se representan ratas características de cada lote de animales.

las demás porfirinas, para el lote FB + HCB que para el lote HCB. Esto estaría indicando una actividad disminuída de Uro-D más tempranamente para el lote FB + HCB que para el lote HCB. Es de hacer notar que la naturaleza de porfirinas permanece constante entre la 6a. y 10a. semana de tratamiento para el lote FB + HCB mientras que para el lote HCB ocurre lo mismo entre la 8a. y 10a. semana.

1.d. Porfirinas en hígado: Cantidad acumulada y naturaleza de las mismas.

Después de sacrificar los animales y extraer los hígados se determinó el contenido de porfirinas en los mismos (Fig. 35). Se observa que en la 3er. semana de tratamiento ya hay un pequeño aumento en la acumulación de porfirinas en hígado para el lote FB + HCB únicamente. El lote HCB comienza a aumentar recién a la 5a. semana. Se nota por lo tanto que concuerdan los promedios de excreción de porfirinas y acumulación de las mismas en hígado, con respecto a las semanas de tratamiento. Durante todo el experimento se observa, que a partir de la 3er. semana, los contenidos promedios del lote FB + HCB superan a los de HCB. Para el lote HCB se llega a valores promedios de 300 $\mu\text{g/g}$ hígado mientras que para el FB + HCB se llegan a valores de 600 $\mu\text{g/g}$ hígado. Por lo tanto el lote HCB aumentaría 60 veces respecto a los valores normales mientras que el FB + HCB 120 veces,

Durante todas las semanas los animales intoxicados con FB acumulan cantidades normales de porfirinas en sus hígados. En cuanto a la naturaleza de porfirinas en hígado, en la primer semana de tratamiento con FB y HCB se detecta sólo trazos de Copro y Proto.



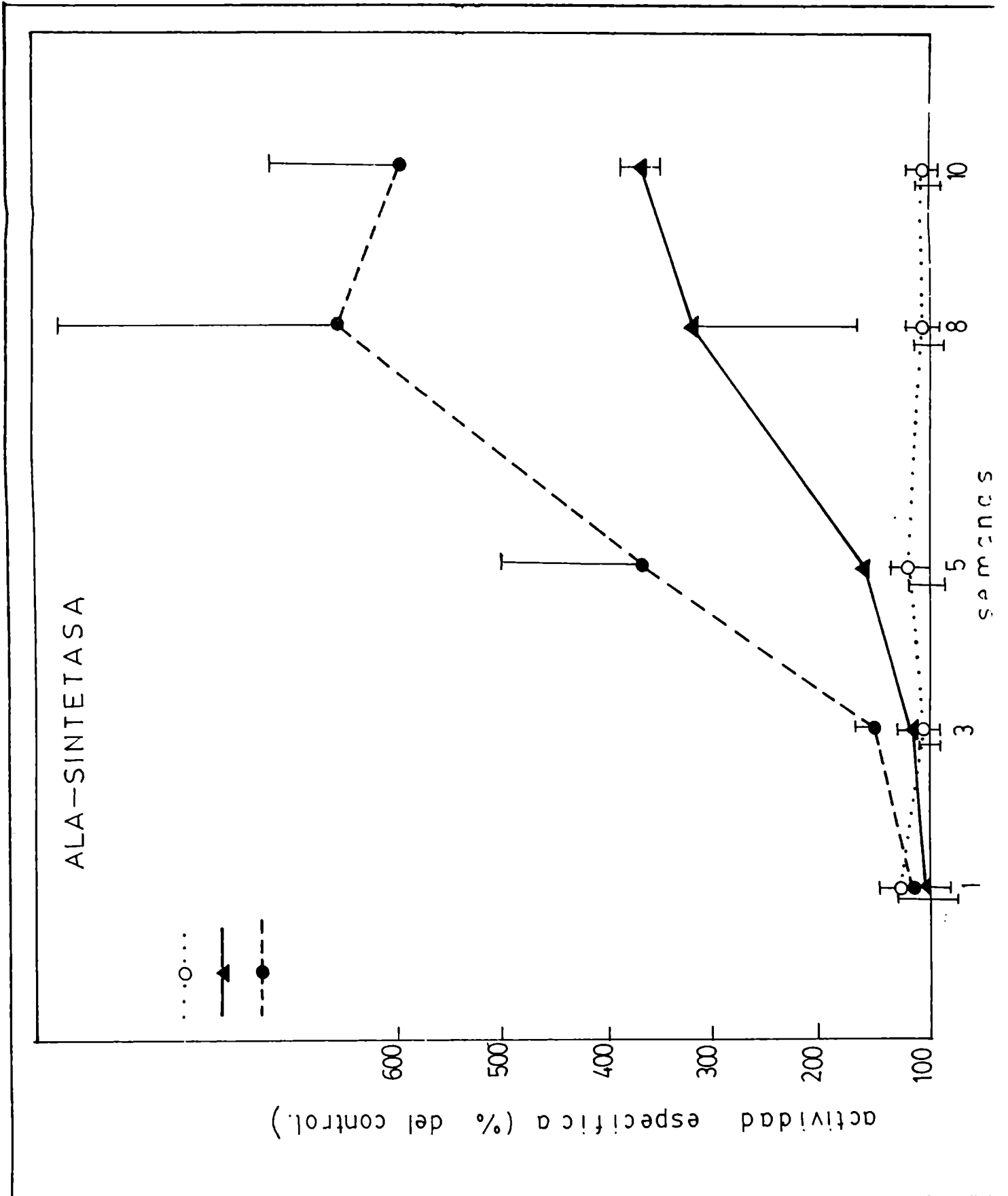
Las barras indican los valores promedios \pm E.S. en función de las semanas de tratamiento para los distintos grupos de animales. Se grafica el promedio de 5 a 6 animales para cada grupo de animales y para cada semana. La determinación se realiza sobre alícuotas de homogenato de 1-3ml para los animales normales y 0.3-1ml para los animales porfiricos.

En la 3er. semana de tratamiento ya se encuentra una gran proporción de porfirinas con número alto de carboxilos, Uro y Firia; siendo la proporción de Uro 60%, Firia 35% y trazos de hexa y penta. La proporción de Uro va aumentando a expensas de Firia en función de las semanas de tratamiento. En la semana 10 ya no se observa penta ni Hexa, siendo la cantidad de Uro: 70% y Firia 30%. Estas proporciones ya no varían con el tiempo de intoxicación, Son las proporciones que se encuentran en animales muy porfíricos.

No se hallaron diferencias significativas en función de las semanas de tratamiento, en cuanto a la naturaleza de las porfirinas para el lote FB + HCB respecto al lote HCB. Tanto en los animales normales como en los drogados con FB, se detectó sólo trazas de Copro y Proto a lo largo de todo el experimento.

1.e. Actividad de ALA-S, ALA-D y Uro-D.

La Fig. 36 representa la actividad específica de ALA-S, enzima clave y regulatoria de este camino metabólico, en función de las semanas de tratamiento, La actividad específica se graficó como % del control o sea al promedio de normales de cada experiencia se dió el valor de 100 y a dicho valor se refirieron los promedios de los distintos lotes. Se observa que para el lote FB + HCB la actividad específica tiene ya un incremento significativo a la 3er. semana mientras que para el lote HCB este mismo aumento de actividad se observa recién a la 5a. semana, Durante las demás semanas hay mayores diferencias entre el lote que recibe las 2 drogas y el que recibe HCB sólo. En todas las semanas la actividad específica del lote FB + HCB



supera a la del lote HCB. No se observan diferencias significativas entre los animales normales y los que ingieren sólo FB. La Fig. 37 muestra la actividad específica de ALA-D, enzima que cataliza el segundo paso en el camino metabólico del hemo que lleva a la formación de PBG.

En la 1a. y 3a. semana no se observan diferencias significativas entre los animales drogados con HCB y los normales. Es de hacer notar en cambio que los animales drogados tanto con FB solo como con FB + HCB disminuyen su actividad específica respecto a los valores normales en la 1a. y 3a. semana de tratamiento. El lote FB sigue manteniendo sus valores por debajo de los normales durante las sucesivas semanas del experimento. En la semana 5a. hay un pequeño incremento en la actividad específica para el lote HCB mientras que para el lote FB + HCB este incremento es muchísimo mayor. Así mientras el lote HCB aumenta solo un 10% el lote FB + HCB aumenta casi un 100%. Este último se mantiene en las siguientes semanas sin variar prácticamente su actividad. El lote HCB va aumentando su actividad tendiendo a alcanzar durante la 8a. y 10a. semanas las actividades que corresponden al lote FB + HCB.

Otra enzima que se analizó en este estudio fué la Uro-D ya que ésta es una enzima clave en la acción de los compuestos halogenados. Dicha enzima es la que descarboxila secuencialmente el Uro'gen para dar copro'gen. La actividad de la enzima Uro-D se midió como desaparición de Uro'gen (Fig. 38) y como aparición de Copro'gen (Fig. 39). En estos experimentos se midió la actividad de esta enzima en sobre-

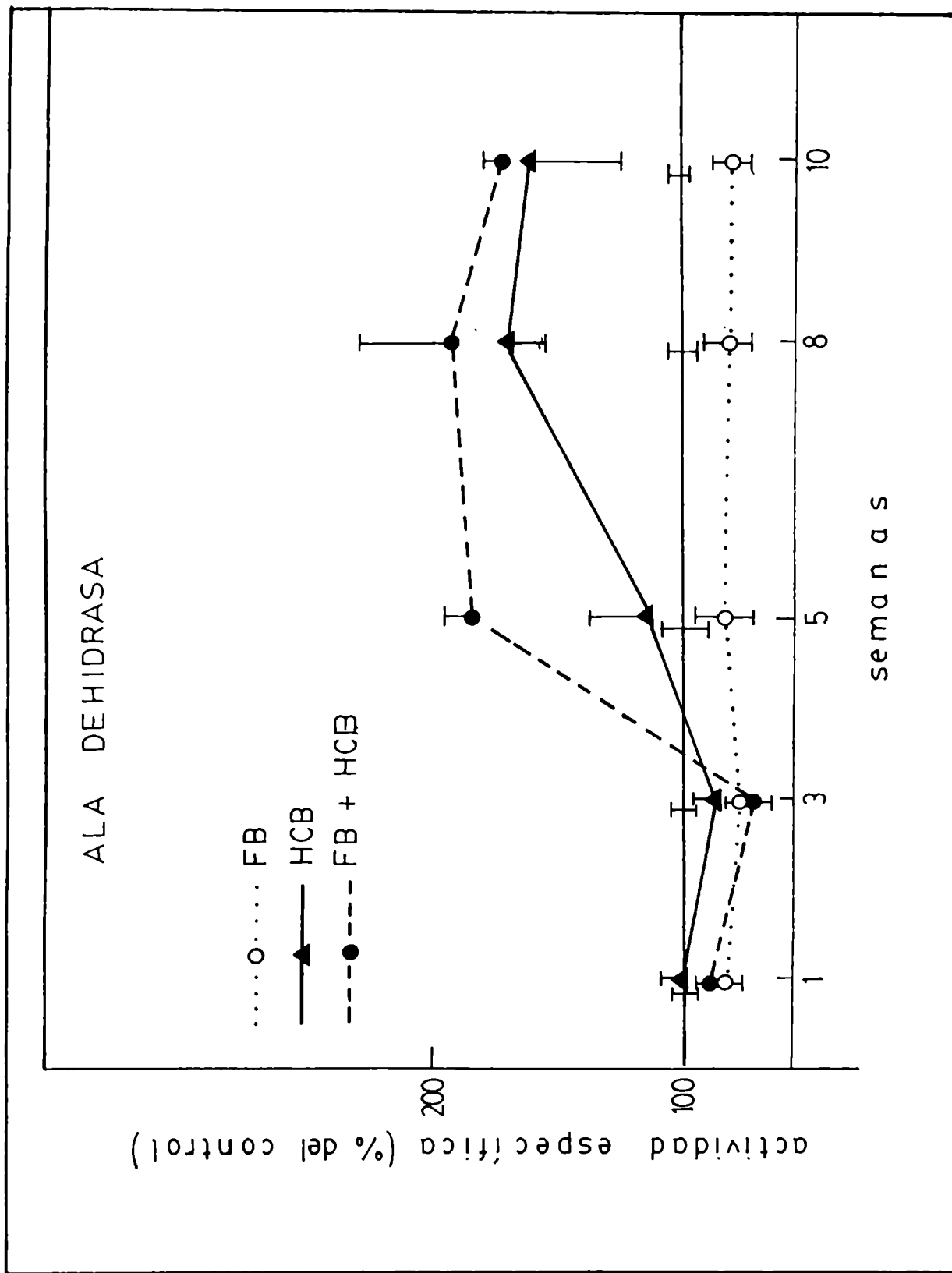


Fig. 37

La actividad de ALA-D se determina en sobrenadante de 11000g como se detalla en métodos. La mezcla de incubación se detalla en la Fig. 16 siendo la cantidad de proteínas incubadas entre 1 y 1.4mg cada punto es el promedio de 5 a 6 animales \pm ES siendo el valor normal 15.5 ± 0.8 nmoles PBC/h/mg prot.

Fig. 38 UROPORFIRINOGENO — DECARBOXILASA

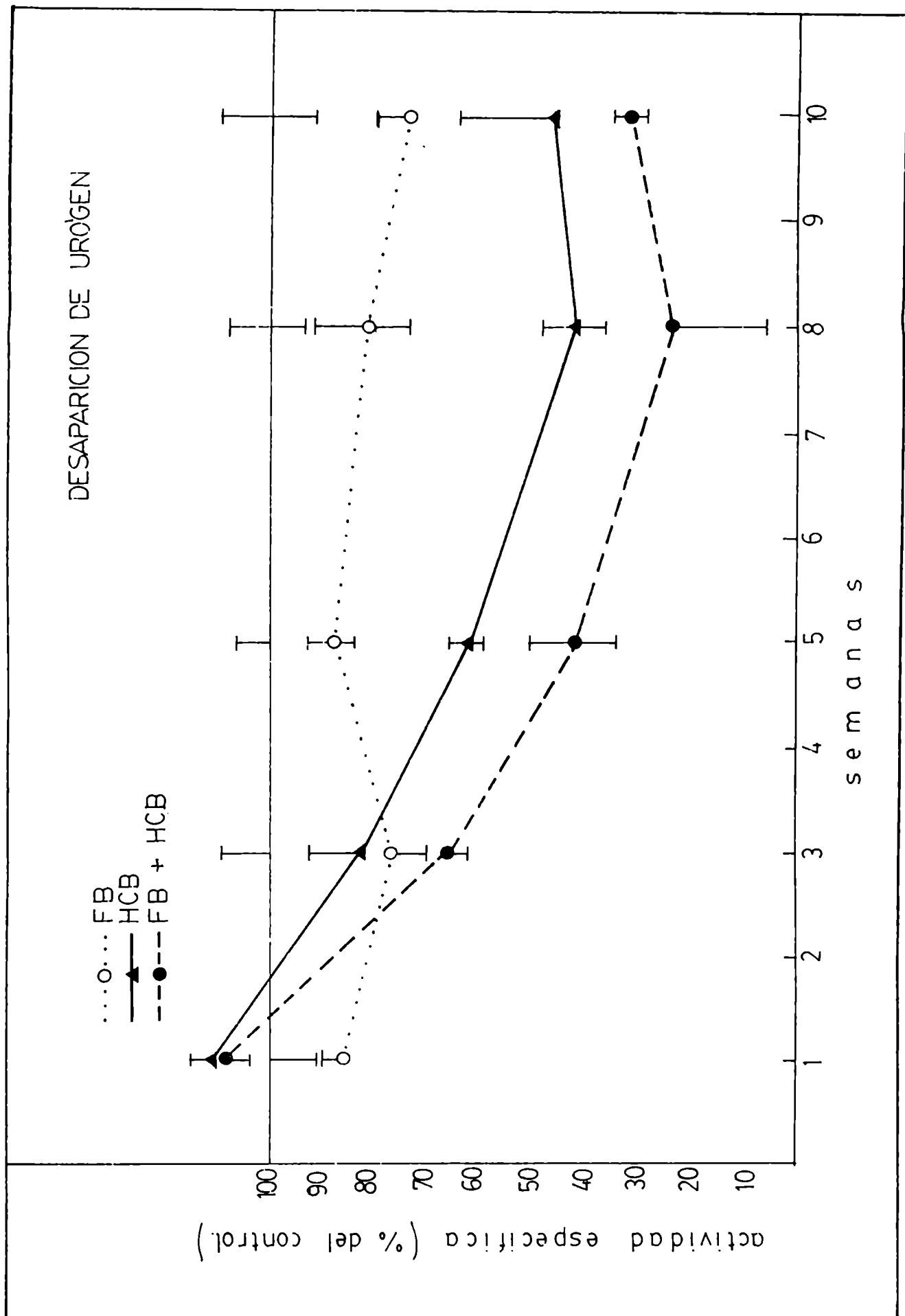
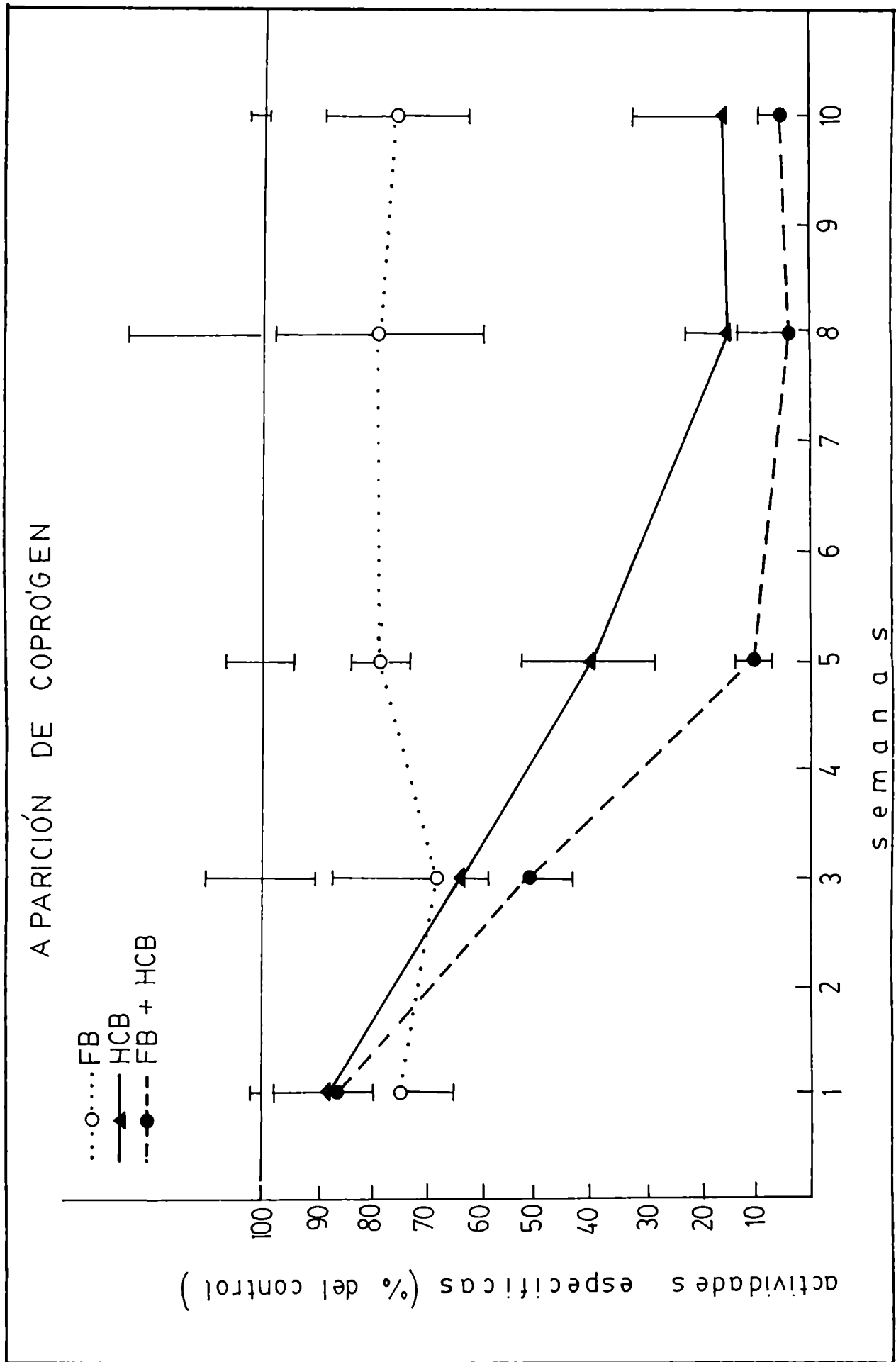


Fig. 38

Fig.39 UROPORFIRINOGENO - DECARBOXILASA



La actividad de Uro-D se determina como en la Fig. 38. Cada punto representa el promedio de las actividades de 5 animales \pm F.S. siendo el valor normal 0.15 ± 0.01 . Se graficaron las actividades esperificas como del control

nadantes de 11.000 g de homogenatos en ClK 0.134 M. Los sobrenadantes del lote HCB y FB + HCB contenía una cantidad elevada de porfirinas las cuales interfieren en la determinación enzimática. Por esta razón estos sobrenadantes fueron pasados a través de columnas de Sephadex G-25 equilibradas previamente con buffer $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}/\text{PO}_4\text{HK}_2$. Se realizó un pool con los eluidos que contenían la proteína enzimática y no las porfirinas. Se obtiene una buena separación ya que la proteína sale con el V_0 de la columna mientras las porfirinas salen después. Los sobrenadantes de ratas normales y de tratadas con FB se incubaron directamente ya que se verificó que la actividad específica era la misma, pasado o no el sobrenadante por columna.

En la Fig. 38 la actividad de Uro-D está dada como desaparición de Uro'gen (1a. etapa de descarboxilación) en función de las semanas de tratamiento. En la 3er. semana ya hay un descenso de la actividad específica para el lote HCB y FB + HCB, siendo el % del control 65 y 84% respectivamente. Este descenso de actividad se hace mayor a medida que transcurren las semanas notándose que siempre los valores del lote FB + HCB están por debajo de los de HCB solo.

El lote FB varía su actividad específica alrededor del 80% del control durante el transcurso del experimento o sea disminuye su actividad respecto al normal. El lote HCB llega a tener una actividad de un 42% del control normal a la 8a. semana de tratamiento mientras el lote FB + HCB llega a tener una actividad de

25% a la 8a. semana de tratamiento.

La Fig. 39 representa las actividades específicas de la 2a. etapa de decarboxilación de Uro-D que es el pasaje de Firia → → → Copro o sea la aparición de Copro'gen. Al igual que en la Fig. 38 aparece disminución de la actividad enzimática a la 3er. semana de tratamiento tanto para el lote HCB como para el FB + HCB; siendo mayor para este último. El decremento aumenta en función de las semanas hasta alcanzar en la 8a. semana un 15% de actividad respecto al control para el lote HCB y 2% para el lote FB + HCB. La actividad para el lote FB esta disminuída oscilando entre 70% y 80% del control según las semanas. Es decir que el comportamiento de la 2da. etapa es similar a la de la 1a. sólo que las disminuciones son mayores.

Se quiso investigar si la disminución de la actividad por FB de la ALA-D y Uro-D era debido a la acción de esta droga sobre la enzima o debido a algún otro efecto indirecto,

Se sabe que el FB aumenta la velocidad de síntesis de proteínas microsomales "in vivo" e "in vitro" (141), Podría ocurrir que la actividad de la enzima al drogar los animales con FB no se alterase, pero debido al aumento de proteínas microsomales la actividad específica disminuyese. Para ello se planificó realizar un experimento para determinar ALA-D y Uro-D centrifugando a 105.000 g. De esta forma se elimina la interferencia de las proteínas microsomales,

Se comenzaron a drogar los animales de la misma forma que anteriormente con FB, HCB y FB + HCB y se dispuso de un lote control normal. Se sacrificaron los mismos a la 3a., 5a., y 8a. semana, momento en el cual comenzaba el desarrollo de la enfermedad (3er. semana), para agravarse luego el cuadro enzimático durante la 5a. y 8a. semana.

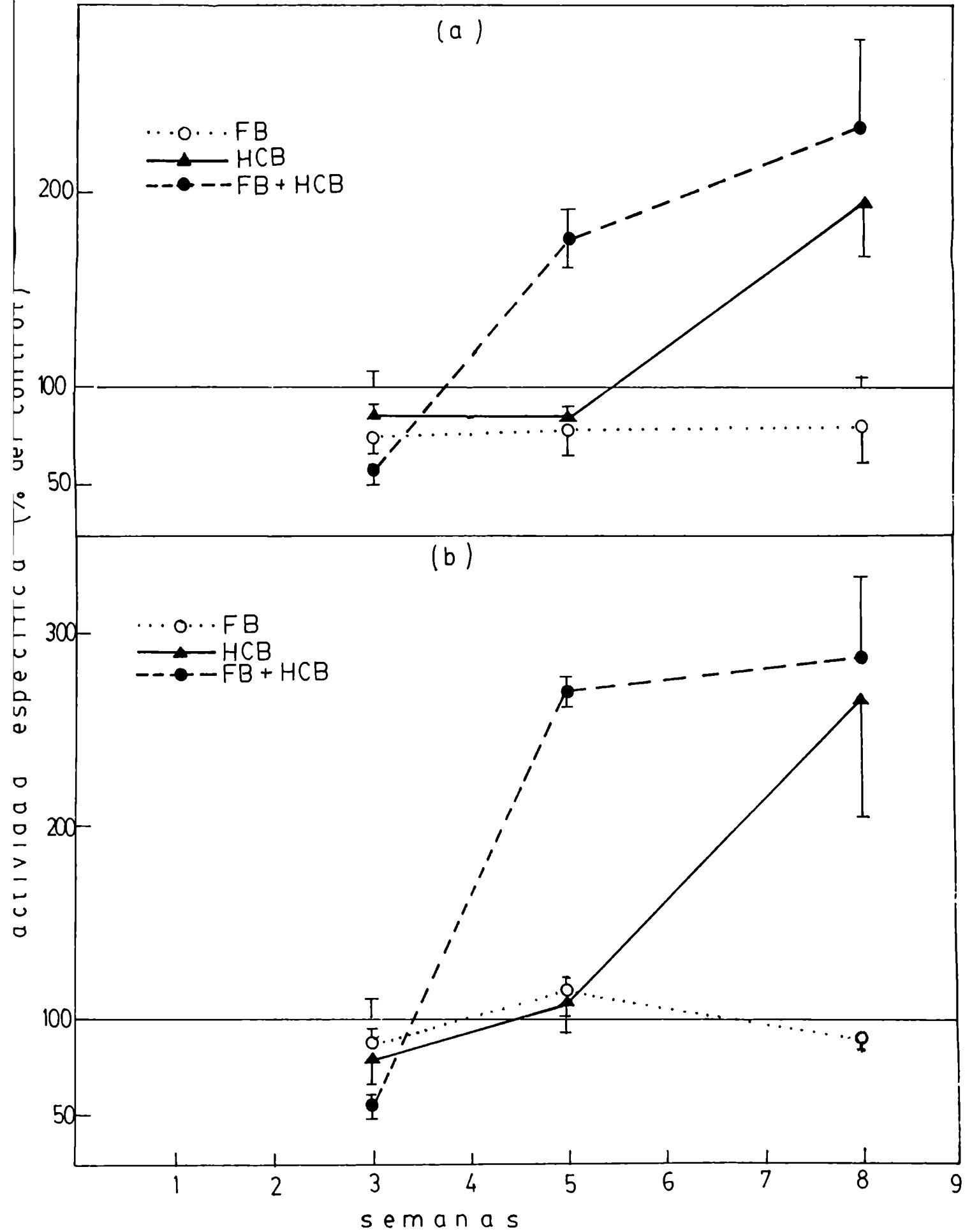
En cada una de las semanas se determinó actividad de ALA-D y Uro-D centrifugando el homogenato a 11.000 g 20 min y a 105.000 g 60 min. y determinando al mismo tiempo la actividad de ambas enzimas centrifugadas a las 2 velocidades. Las determinaciones enzimáticas se realizaron como se detalla en Métodos.

En la Fig. 40 a y 40 b se graficaron las actividades de ALA-D. En la Fig. superior los datos corresponden a la determinación de la actividad específica para sobrenadante de 11.000 g por 20 min. de homogenato de hígado. Se puede observar que en este caso, los valores correspondientes a las actividades de animales drogados con FB dan valores de 75% respecto al control normal. Esto indicaría que el FB produce un 25% de inhibición de la enzima respecto a los normales en todas las semanas de tratamiento.

Si observamos el gráfico (b) en el cual el homogenato de hígado fué centrifugado a 105.000 g por 60 min.; las actividades correspondientes al lote FB dan valores por encima y por debajo de los normales, lo cual indicaría que no existe inhibición de la enzima por FB. La disminución de actividad para el lote FB en todas las semanas

Fig.40

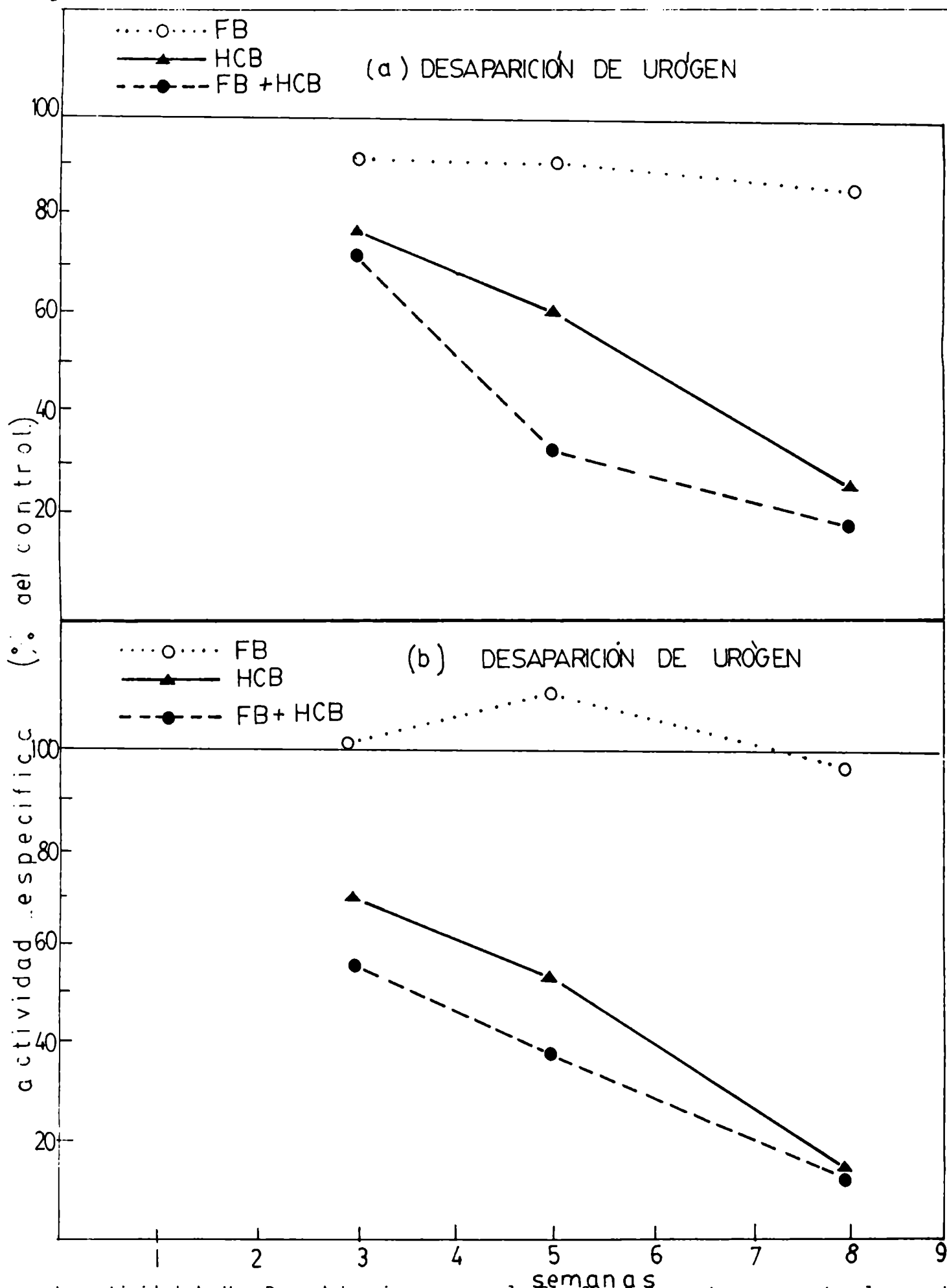
ALA - DEHIDRASA



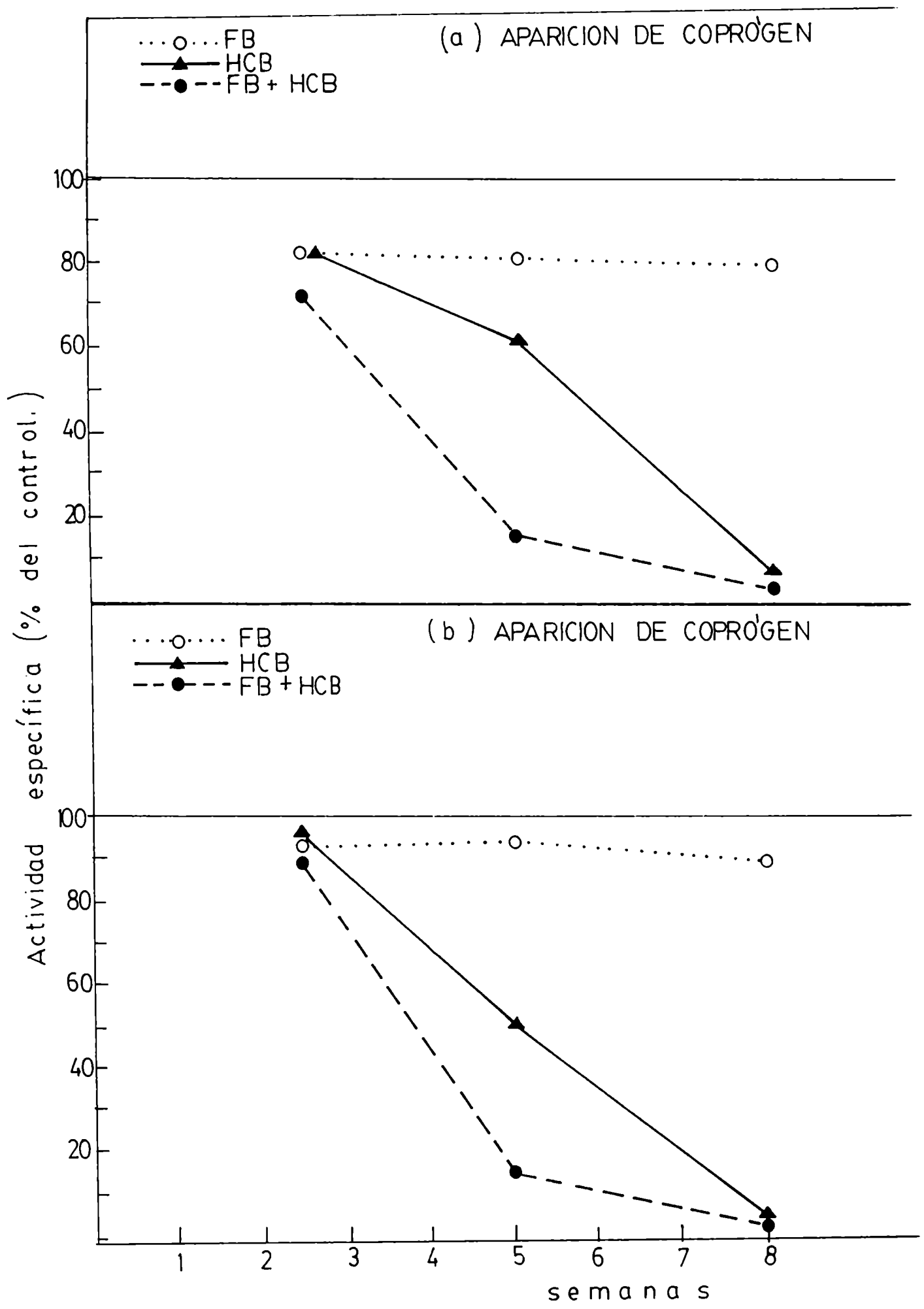
de tratamiento observado al realizar la centrifugación a 11.000 g se debería por lo tanto al aumento de proteínas microsomales las cuales quedan en dicho sobrenadante, Al realizar los cálculos de actividad específica se está dividiendo por una cantidad mayor de proteínas que en el caso normal, y se obtienen por lo tanto una actividad específica menor. Comparando las actividades relativas de los lotes FB + HCB y HCB se observa que al igual que en la Fig. 37 los animales drogados con FB + HCB presentan una respuesta más rápida y mayor que los drogados con HCB solo. La centrifugación a 105.000 g permite observar un mayor incremento de la actividad enzimática respecto al control. Así a la 8a. semana el lote FB + HCB presenta un incremento de un 300 % mientras que cuando se centrifuga a 11.000 g dicho incremento es de aproximadamente 200 %. Es de destacar también que a la 5a. semana la diferencia de actividades enzimáticas entre el lote FB + HCB y HCB, para el caso de centrifugación a 105.000xg es notablemente mayor que para la centrifugación a menor velocidad.

Se llevó a cabo el mismo estudio comparativo para Uro-D que el realizado para ALA-D.

En las Fig. 41 y 42 se pueden ver las dos etapas de decarboxilación de Uro-D. La 1a. etapa es la desaparición de Uro'gen o sea el pasaje de Uro a Firia y la 2a. etapa es la formación de Copro'gen. Cuando se centrifuga a 11.000 g 20 min el homogenato de hígado (Fig. 41)a se observa que todas las actividades específicas para el



La actividad de Uro-D se determina como en la Fig. 38. Cada punto representa el promedio de las actividades de 2 animales. Se incubó 8-10mg de proteínas. (a) Se centrifugan los homogenatos a 11000g (b) Se centrifugan los homogenatos a 105000g.



lote FB caen por debajo de los valores normales, lo cual haría pensar en una disminución de actividad de la enzima Uro-D por efecto del FB. Cuando se realiza la centrifugación a 105.000 g por 60 min. la actividad correspondiente al lote FB, da valores por encima y por debajo de los normales lo cual hace pensar en que no hay inhibición de la enzima por FB sino que la disminución de actividad se debe al aumento de proteínas microsomales. Para los lotes HCB y FB + HCB se observa disminución de actividad a la 3er. semana de tratamiento (Fig. 41 a y b). Esta disminución se acentúa aún más en las siguientes semanas (5a. y 8a). En la 5a. semana de tratamiento la actividad del lote FB + HCB es mucho menor que la del lote HCB. Las actividades de ambos lotes siguen decreciendo en función de las semanas de tratamiento.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en la Fig. 38 donde se obtiene ya en la 3er. semana una disminución de actividad para los lotes HCB y FB + HCB, y una disminución aún mayor a medida que transcurren las semanas de tratamiento.

El mismo análisis se realizó para la Fig. 42 a y b donde aparece la 2a. etapa de decarboxilación observándose también que la disminución de actividad específica para el lote FB es mucho menor cuando se realiza la centrifugación a 105.000 g que cuando la misma se lleva a cabo a 11.000 g.

Respecto a los lotes FB + HCB y HCB se continúa observando que el lote FB + HCB presenta mayor inhibición que el HCB solo.

Conclusiones.

- 1.- Se determinó el peso de hígado respecto al peso de rata en los cuatro lotes de animales N, FB, HCB y FB + HCB observándose que dicha relación aumenta por el tratamiento con FB, con HCB y con ambas drogas (Fig. 28 y 29). Es de destacar que la relación del peso de hígado al peso del cuerpo del animal está siempre en el siguiente orden: FB + HCB > HCB > FB > N,

- 2.- Se midió ALA, PBG y porfirinas excretadas por orina en los 4 lotes (Fig. 30, 31 y 32) observándose que en los animales drogados con FB + HCB los picos de excreción de ALA y PBG y la excreción de porfirinas anteceden en 2 semanas, a las de los tratados sólo con HCB observándose para los 2 primeros casos mayores respuestas en los lotes que reciben las 2 drogas juntas.
Las excreciones de las ratas tratadas con FB están dentro del rango de los valores normales.

- 3.- En ratas normales las porfirinas urinarias excretadas están formadas únicamente por Copro.

En animales intoxicados con HCB hay un 100% de Copro hasta la 4a. semana (Fig. 34). En la 5a. semana hay una disminución de la proporción de Copro a expensas del aumento de la proporción de Uro, Firia y P + H.

En las ratas drogadas con FB + HCB se observa ya una disminución de Copro a expensas de las otras porfirinas, en la 3er. semana. Esta pro-

porción va variando en el mismo sentido durante las siguientes semanas hasta alcanzar en la semana 8a. los siguientes % relativos para: HCB; Copro 47%; P + H 6%; Firia 10%; Uro 37%; FB + HCB: Copro 34%; P + H 6%; Firia 11%; Uro 49%. Los animales intoxicados solo con FB excretan al igual que los normales solo Copro.

El pretratamiento con FB causó una acumulación de porfirinas más temprana y mayor que cuando el HCB se dió sólo. Así la acumulación observada para el lote FB + HCB antecede en 2 semanas y supera al del HCB sólo. Los animales intoxicados con FB sólo poseen una acumulación normal de porfirinas (Fig, 35).

- 4.- La actividad de ALA-S comienza a elevarse a la 3er. semana para el lote FB + HCB mientras que lo realiza a la 5a. para HCB sólo (Fig. 36) ALA-D se eleva a la 5a. semana para FB + HCB y después de la 5a. semana para HCB sólo (Fig. 37) Uro-D descende su actividad en la 3er. semana tanto para el lote FB + HCB como para HCB sólo pero el descenso es mayor cuando se dan las 2 drogas al mismo tiempo que cuando se da HCB sólo. (Fig. 38 y 39).
- 5.- Tanto para ALA-D como Uro-D la centrifugación a 105.000 g por 60 min del homogenato de hígado, comprueba el hecho de que el descenso de actividad observado cuando se trabaja con sobrenadantes de 11.000 xg, para estas 2 enzimas en los animales drogados con FB, no es debido a la acción de esta droga sobre las enzimas sino a un aumento de las proteínas microsomales. Esto hace que la actividad específica dé valores menores que los reales (Fig. 40, 41, y 42).

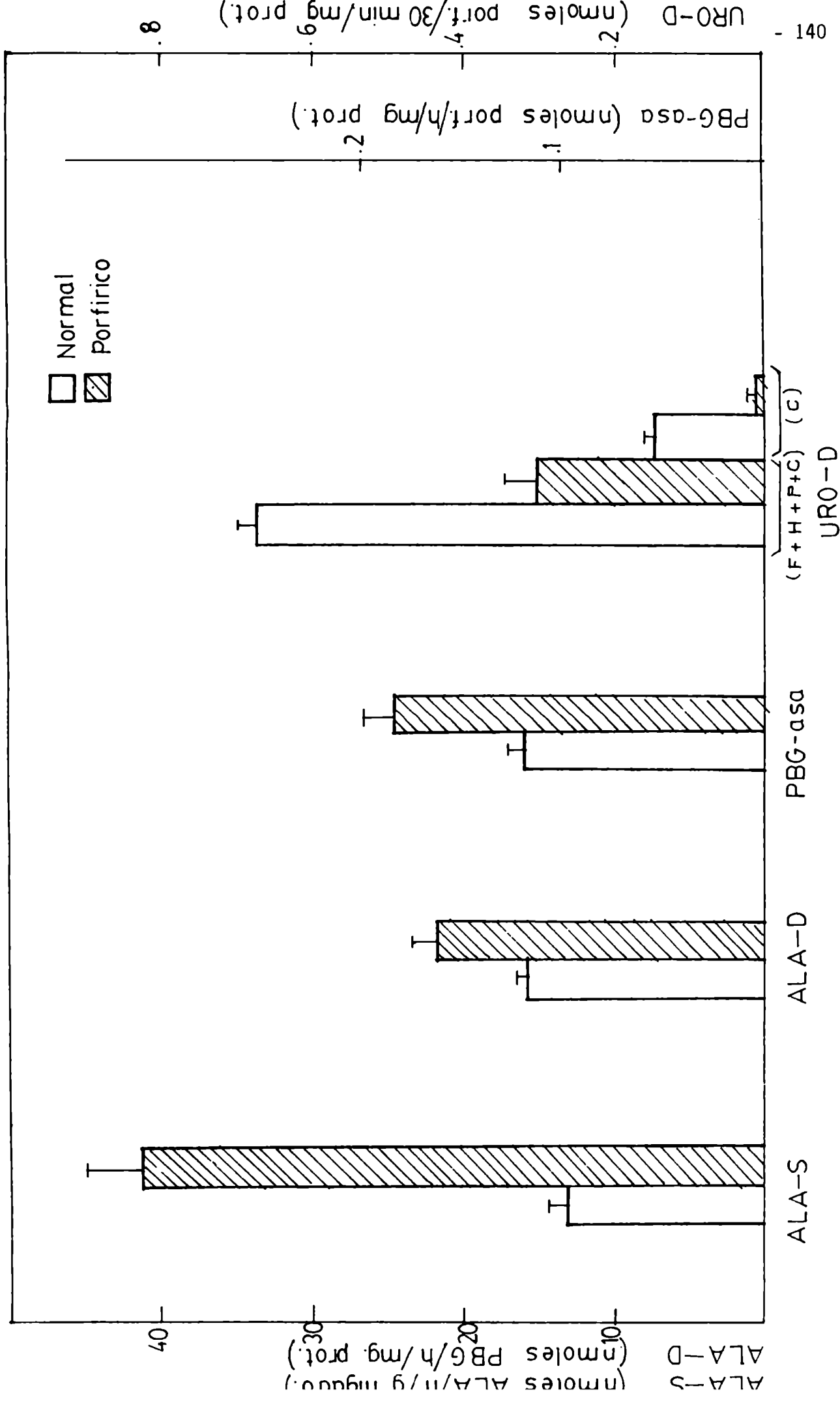
6.- El HCB aumenta la excreción de ALA, PBG y porfirinas en orina, y la acumulación de porfirinas en hígado. Esta droga eleva también la actividad de ALA-S y ALA-D. Uro-D por el contrario se ve profundamente disminuída.

Todos estos efectos provocados por el HCB se ven incrementados y anticipados en el tiempo cuando se administra junto con HCB, FB o sea las dos drogas al mismo tiempo.

En ratas porfíricas por HCB, la actividad de las enzimas ALA-S, ALA-D y PBG-asa aumenta respecto a los animales normales siendo los incrementos porcentuales de 300, 38, y 46 respectivamente, (Fig. 43 y 44). La enzima Uro-D decrece drásticamente como consecuencia de la intoxicación por HCB con un decremento del 82% para la 2a. etapa de descarboxilación (Fig. 44).

En la Fig. 44(b) se observa el decrecimiento de la actividad de Uro-D tomando como 100% el valor de actividad del porfírico y calculando el porcentaje de aumento del normal respecto al porfírico. De esta forma se ve que la enzima más afectada es la Uro-D. La observación de la Fig. 44(a) nos haría pensar que la enzima más afectada es la ALA-S lo cual no es correcto, Esta diferencia se debe a que tomando la disminución del porfírico respecto al normal no puede ser nunca mayor que un 100%. Consi

Fig. 43 EFECTO DEL HCB "IN VIVO" SOBRE LAS PRIMERAS ENZIMAS DEL CAMINO DEL HEMO

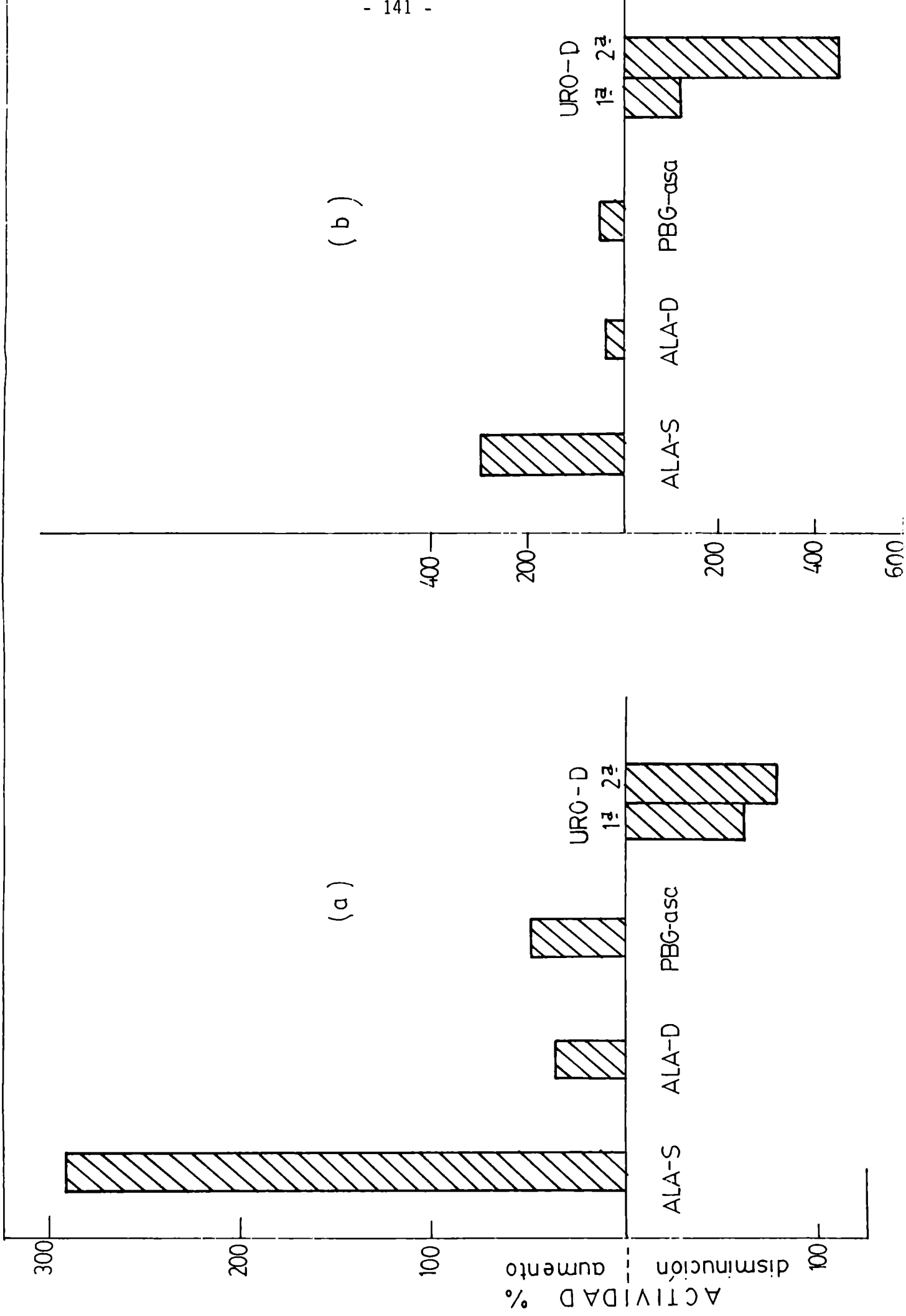


Las barras representan promedios de 8 a 10 animales normales y porfiricos \pm E.S. Se grafican para Uro-D las 2 etapas de decarboxilación; la primera que representa la desaparición de Uro y la segunda la aparición de Copro. Las determinaciones enzimáticas se realizan como se indica en Métodos.

Fig. 44.

Las barras representan los porcentajes de aumento y disminución de actividad respecto a un control normal y representan el promedio de las actividades de 8 a 10 animales. Las actividades enzimáticas se miden como se indica en Métodos. En (b) el % de disminución de Uro-D se calcula considerando 100% el valor de actividad del porfirico y calculando el porcentaje de aumento del normal respecto del porfirico.

Fig.44 AUMENTO Y DISMINUCION DE LAS ENZIMAS PROVOCADAS POR HCB IN VIVO.



derando estos resultados, se quiso investigar si el aumento de ALA-S, ALA-D y PBG-asa y el decremento de Uro-D (Figs. 43 y 44) eran debido a un efecto a nivel de actividad enzimática, es decir se quiso investigar la posibilidad de la existencia de un activador o inhibidor. Para determinar esto se realizaron los experimentos que se detallan en los tópicos 2 y 3.

2.- EFFECTO DEL AGREGADO DE SOBRENADANTE DE HOMOGENATO DE HIGADO PORFIRICO POR HCB Y DESPROTEINIZADO POR CALENTAMIENTO SOBRE LAS ACTIVIDADES DE DISTINTAS ENZIMAS DE UN HIGADO NORMAL.

2.a.- Condiciones experimentales.

Se trabajó con ratas hembras Wistar de 180 g. de peso aproximadamente. Se administró HCB por sonda gástrica hasta severa porfiria (aprox. 3 meses). Dosis administrada: 1 g/kg peso. Se utilizaron ratas normales que correspondían al mismo lote que las porfíricas.

Se determinó el grado de porfiria de los animales por observación de las bandan características de porfirinas en orina con un espectroscopio.

2.b.- Efecto del agregado de sobrenadante de homogenato de hígado porfirico por HCB y desproteinizado por calentamiento sobre la actividad de ALA-S de un hígado normal.

Se homogeneizó hígado de rata normal e hígado de rata porfírica

para determinar ALA-S como se detalla en Métodos. Una parte de dichos homogenatos se calentaron 5 min a 100°C y se centrifugaron para separar el precipitado y el sobrenadante. Un volumen de estos sobrenadantes equivalentes a 0.5 ml de homogenato fue añadido a 0.5 ml de homogenato de hígado normal. Se adicionó además todos los reactivos correspondientes a la mezcla de incubación. Estos ensayos representan los homogenatos normales con la adición de cantidades equivalentes de homogenatos normales o porfíricos calentados y centrifugados ($H_N + \Theta H_{N_S}$) y ($H_N + \Theta H_{P_S}$) respectivamente

Por otro lado se quiso determinar también el efecto del agregado de homogenatos normales y porfíricos calentados pero sin centrifugar. Para ello se pipeteó en distintos tubos que se usan para incubar 0.5 ml de homogenato de hígado normal y en otros 0.5 ml de homogenato de hígado porfírico, se calentó 5 min a 100°C, se enfrió y luego de colocarlo en hielo se agregó 0.5 ml de homogenato normal y el resto de reactivos que corresponden a la mezcla de incubación. Estos ensayos representan los homogenatos normales con la adición de cantidades equivalentes de homogenatos normales y porfíricos enteros ($H_n + \Theta H_{N_E}$) y ($H_N + \Theta H_{P_E}$) respectivamente .

En la Fig.36 se observa que la actividad de ALA-S aumenta en los animales intoxicados con HCB. Estos experimentos son por lo tanto para investigar si en los hígados porfíricos existe algún activador que aumente la actividad de ALA-S.

En la Tabla VII se observa que el agregado de homogenato porfírico desproteínizado ya sea añadido entero o sobrenadante de una

TABLA VII. EFECTO DEL AGREGADO DE UNA PREPARACION DE HIGADO PORFIRICO DESPROTEINIZADO POR CALOR SOBRE ALA-SINTETASA NORMAL.

PREPARACION ENZIMATICA (HOMOG.)	HOMOGENATO DESPROTEINIZADO (Ø 5 MIN. 100°C)	ALA-SINTETASA ACTIVIDAD ENZIMATICA (NMOLES ALA/H/G HIGADO).	ACTIVIDAD RELATIVA	ACTIVACION
HN	ØHNE	15.8	1	-
HN	ØHIPE	11.6	0.7	NO
HN	ØHNS	14.6	1	-
HN	ØHPS	8.5	0.6	NO

HN: Hígado Normal

E: entero

HP: Hígado Porfírico

S: sobrenadante.

Cada valor es el promedio de 3 animales normales y 3 porfíricos. La determinación enzimática se realizó según se detalla en Métodos.

centrifugación da una actividad relativa de 0.7 y 0.6 cuando se compara con un homogenato normal al que se le adicionó homogenato normal calentado entero o sobrenadante. Esto implicaría que no existe activación.

2.c.- Efecto del agregado de sobrenadante de homogenato de hígado porfírico por HCB y desproteinizado por calentamiento sobre la actividad de ALA-D de un hígado normal,

Se homogeneizó hígado de rata normal y de rata porfírica como se detalla en Métodos. Se centrifugó a 11.000 g 20 min y 0.05 ml de este sobrenadante se utilizó como fuente enzimática. Se desproteinizó parte de dicho sobrenadante de igual manera que en b. Se tomaron cantidades de desproteinizado equivalentes a 0,05 ml de sobrenadante para añadirles a los incubados, La adición del calentado entero o del sobrenadante del calentado (Tabla VIII) a una preparación enzimática normal no produce activación en ALA-D.

2.d.- Efecto del agregado de sobrenadante de homogenato de hígado porfírico por HCB y desproteinizado por calentamiento sobre la actividad de PBG-asa de un hígado normal.

Se homogeneizó hígado de rata normal y porfírica como se detalla en Métodos. Después de centrifugar a 11.000 g 20 min. el sobrenadante porfírico se pasó a través de columna de Sephadex G-25 para eliminar las porfirinas endógenas, Parte del sobrenadante normal se pasó también a través de columna de Sephadex G-25. Esto se realizó para que los agregados normales y porfíricos calentados se

TABLA VIII. EFECTO DEL AGREGADO DE UNA PREPARACION DE HIGADO PORFIRICO DESPROTEINIZADO POR CALOR SOBRE ALA DEHIDRASA NORMAL.

PREPARACION ENZIMATICA (SOBREN.)	SOBRENADANTE DESPROTEINIZADO (\emptyset 5MIN. 100 \pm C)	ALA-DEHIDRASA ACTIVIDAD ENZIMATICA (NMOLES PBG/H/MG PROT.)	ACTIVIDAD RELATIVA	ACTIVACION
HN	\emptyset NE	12.8	1	-
HN	\emptyset PE	12.6	1	NO
HN	\emptyset NS	12.9	1	-
HN	\emptyset PS	13.1	1	NO

HN: Hígado normal

E: entero (sobrenadante de 11000 g 20' \emptyset 5 min 100 \pm)

HP: Hígado porfírico

S: sobrenadante (sobrenadante de 11000g 20' \emptyset 5 min 100 \pm C y centrifugado descartando el precipitado).

Cada valor representa el promedio de 3 animales normales y 3 porfíricos. La incubación se realizó como se detalla en Métodos. Proteínas incubadas: 1 mg.

hallasen en igualdad de condiciones. Como preparación enzimática se utilizó 0.4 ml de sobrenadante de 11.000 g 20 min. al cual se adicionó una cantidad equivalente de sobrenadante de 11.000 g 20 min de homogenato de hígado normal o porfírico pasados por columnas de Sephadex G-25 y luego desproteinizados en la misma forma que en b pero incluyendo cantidades equivalentes a 0.4 ml de sobrenadante.

Ya se había determinado previamente que los animales porfíricos por HCB presentaban un aumento de actividad de aproximadamente 50% para esta enzima (Fig, 43).

En la Tabla IX se observa que al agregar un sobrenadante G-25 desproteinado entero de hígado porfírico a un sobrenadante de 11.000 g normal se produce un 24% de activación respecto al ensayo cuando se agrega sobrenadante G-25 desproteinado entero de hígado normal. En el caso de agregar dicho sobrenadante desproteinado pero centrifugado se observa sólo un 11% de activación.

Estos datos indicarían que en los hígados porfíricos existe un activador de la PBG-asa. Parte de dicho activador queda en el sobrenadante del desproteinado por calentamiento 5 min a 100°C y parte queda en el precipitado proteico ya sea disuelto en el sobrenadante embebido en el mismo o unido a las proteínas del mismo.

2.e.- Efecto del agregado de una preparación de hígado porfírico desproteinado por calor sobre uroporfirinógeno decarboxilasa normal.

Se trabajó de la misma forma que en d) pero utilizando un

TABLA IX. EFECTO DEL AGREGADO DE UNA PREPARACION DE HIGADO PORFIRICO DESPROTEINIZADO
 POR CALOR SOBRE PORFOBILINOGENASA NORMAL.

PREPARACION ENZIMATICA (SOBRE. 11000G)	SOBRENADANTE/G-25 DESPROTEINIZADO (Ø 5 MIN. 100°C).	PORFOBILINOGENASA ACTIVIDAD ENZIMA- TICA (NMOLES PORF/H/MG PROT.)	ACTIVIDAD RELATIVA	% ACTIVACION
HN	ØHNE	0.17	1	
HN	ØHPE	0.21	1.24	24
HN	ØHNS	0.18	1	
HN	ØHPS	0.20	1.11	11

HN: Hígado Normal

HP: Hígado Porfírico

E: entero (sobrenadante de 11000 g pasado a través de G-25 Ø 5min a 100°C)

S: sobrenadante (la misma preparación anterior centrifugada a 900 g 5';
 se usó el sobrenadante de la misma).

Cada valor representa el promedio de 3 animales normales y 3 porfíricos. La determinación enzimática se realizó según se detalla en Métodos.

volumen de preparación enzimática para HN de 0.25 ml, y una cantidad equivalente de sobrenadante de 11.000 g/G-25 desproteinizado por calentamiento. Al agregar el desproteinizado entero (Tabla X) hay una inhibición de 20% en la actividad de la 1a. etapa y de un 52% para la 2a. etapa. Cuando se agrega el sobrenadante del desproteinizado a HN, se obtiene un decremento de un 15% para la 1ra. etapa y de un 48% para la 2a. etapa. Estos resultados nos harían pensar que en los hígados porfíricos existe un inhibidor de la Uro-D. La mayor parte de este inhibidor se desprendería por calentamiento y una muy pequeña cantidad quedaría retenido en el precipitado proteico. Esto es una consecuencia de que el agregado de desproteinizado entero provoca una disminución algo mayor, aunque bastante semejante, de actividad que el sobrenadante de desproteinizado.

Conclusiones.

El agregado de preparaciones desproteinizadas de homogenatos y sobrenadantes de hígados porfíricos a preparaciones normales no modificó la actividad de ALA-S y ALA-D normal. En PBG-asa, al adicionar los desproteinizados porfíricos se produjo una activación de un 24% y en Uro-D un decremento de actividad de 15% para la 1a. etapa (Desaparición de Uro'gen) y de 52% para la 2a. etapa (Aparición de Copro'gen). Esto nos estaría indicando que los homogenatos y sobrenadantes porfíricos no liberan por calentamiento ningún metabolito que active las enzimas ALA-S y ALA-D. Se liberaría en cambio algún o algunos metabolitos que actuarían: a) sobre la PBG-asa normal

TABLA X. EFECTO DEL AGREGADO DE UNA PREPARACION DE HIGADO PORFIRICO DESPROTEINIZADO
 POR CALOR SOBRE UROPORFIRINOGENO DECARBOXILASA NORMAL.

PREPARACION ENZIMATICA	SOBRENADANTE/ G-25 DESPRO- TEINIZADO	ACTIVIDAD ENZYMATICA (<u>NMOLES DE PORFIRINAS</u>)		INHIBICION DE URO'GEN	INHIBICION COPRO'GEN	INHIBICION
		DESAPARICION DE URO'GEN	MG PROTEINAS/30 MIN.			
HN	ØHNE	0.59	-	0.27	-	-
HN	ØHPE	0.47	20	0.13	52	52
HN	ØHNS	0.59	-	0.27	-	-
HN	ØHPS	0.59	15	0.14	48	48

HN: Hígado normal. E: entero (sobrenadante de 11000 g pasado a través de G-25 Ø 5min a 100°C).

HP: Hígado porfírico. S: sobrenadante (la misma preparación anterior centrifugada a 900 g 5 min; se usó el sobrenadante de la misma).

Cada valor representa el promedio de 3 animales normales y 3 porfíricos. La preparación enzimática contiene Uro'gen III:2.2 µM; proteínas 7-9 mg. Los otros componentes y detalles experimentales se indican en Métodos.

aumentando su actividad y b) sobre la Uro-D normal disminuyendo su actividad. Estos efectos son mayores cuando se agrega el sobrenadante/G-25 desproteinizado entero que cuando se centrifuga para eliminar el precipitado.

3.- EFFECTO DEL AGREGADO DE UNA PREPARACION ENZIMATICA DE HIGADO PORFIRICO SIN CALENTAR SOBRE LAS ACTIVIDADES DE DISTINTAS ENZIMAS DE HIGADO NORMAL.

3.a.- Actividad de ALA-S de mezclas de preparaciones de hígados normales y porfíricos.

Los hígados normales y porfíricos fueron homogeneizados y la incubación realizada como se indica en Métodos. Como volumen de preparaciones enzimáticas se tomaron 0.25 ml para las determinaciones normales y 0.25 ml para las determinaciones porfíricas. Para los ensayos cruzados se incubó 0.5 ml de homogenato el cual correspondía 0.25 ml a la enzima normal y 0.25 ml a la enzima porfírica. Ya habíamos visto previamente que en ratas intoxicadas con HCB la actividad de esta enzima aumentaba. Si este aumento fuese debido a un activador existente en el hígado porfírico, la suma de los nmoles de ALA formado por mezcla de reacción (Tabla XI) del ensayo individual de la enzima de hígado de rata normal, más los nmoles de ALA formado por mezcla de reacción del ensayo individual de la enzima de hígado de rata tratada con HCB debería ser menor (se indica en la Tabla como esperado si fuese aditivo), que los nmoles de ALA for-

mados por mezcla de reacción en el ensayo cruzado, o sea al colocar en el medio de incubación 0.25 ml de enzima normal y 0.25 ml de enzima porfírica (se indica en la tabla como observado),

Lo observado (Tabla XI) expresado como % de lo esperado es menor que 100, lo cual implica que no existe activación de la enzima normal al agregar al medio de incubación la enzima porfírica.

3.b.- Actividad de ALA-D de mezclas de preparaciones de hígados normales y porfíricos.

Se homogeneizaron, centrifugaron e incubaron hígados de ratas normales y porfíricas por HCB según se indica en Métodos. El volumen de incubación para sobrenadantes normales y porfíricos separadamente fue de 0.025 ml. El volumen de incubación del ensayo cruzado fué de 0.5 ml, el cual correspondía a 0.025 ml del normal y 0.025 ml del porfírico. Los valores de observado, esperado si fuese aditivo y activación se interpretan igual que en a).

En La Tabla XII los nmoles de PBG formado/mezcla de reacción para el ensayo cruzado son menores que los nmoles de PBG esperados/mezcla de reacción si fuese aditivo siendo este valor 95% de lo esperado. Esto implica que no existe activación de la enzima normal por el sobrenadante porfírico.

3.c.- Actividad de PBG-asa de mezclas de preparaciones de hígados normales y porfíricos.

Los hígados de ratas normales y porfíricas se homogeneizaron con CLK 0.154 M, se centrifugaron a 11.000 g y se pasaron a través

TABLA XI. ACTIVIDAD DE ALA-SINTETASA DE MEZCLAS DE PREPARACION DE HIGADOS NORMALES Y PORFIRICOS.

VOLUMEN INCUBADO
HOMOGENATO.

A L A - S I N T E T A S A

- 153 -

N	HCB	ESPERADO		ACTIVACION.
		OBSERVADO	SI FUESE OBSERVADO ADITIVO.	

ML	NMOLES ALA FORMADO / /MEZCLA DE REACCION,	% DE LO ESPERADO
----	--	---------------------

0.25	-	1.22	
-	0.25	2.97	
0.25	0.25	3.75	89 NO

La preparación enzimática y la incubación se realizó como se detalla en Métodos. Los valores representan promedios de 4 animales.

TABLA XII. ACTIVIDAD DE ALA-DEHIDRASA DE MEZCLAS DE PREPARACIONES DE HIGADOS NORMALES Y PORFIRICOS.

VOLUMEN INCUBADO		A L A - D E H I D R A S A		ACTIVACIÓN
SOBRENADANTE DE HOMOGENATO		ESPERADO	OBSERVADO	
N	HC B	OBSERVADO	SI FUESE ADITIVO	
ML		NMOLES PBG FORMADO / MEZCLA DE REACCIÓN	% DE LO ESPERADO	
0.025	-	9.54		
-	0.025	11.26		
0.025	0.025	19.75	20.80	95 NO

La preparación enzimática y la incubación se realizó como se detalla en Métodos. La mezcla de incubación contenía 1.2 mg de proteína para los ensayos de animales normales (N) e intoxicados (HC B) por separado y 2.4 mg de proteína para los que contenían ambas preparaciones enzimáticas (N y HC B).

de columna de Sephadex G-25.

El volumen incubado fué de 1 ml, tanto para animales normales como para tratados. Para el ensayo cruzado se incubaron 2 ml de preparación enzimática correspondiendo la mitad de volumen al normal y la mitad al porfírico.

Los valores de observado, esperado si fuese aditivo y activación se interpretan igual que en a).

En esta enzima los nmoles de porfirina esperado/mezcla de reacción si fuese aditivo son menores que los nmoles de porfirina formada/mezcla de reacción observado. Este se refleja en que se observa 119% de lo esperado obteniéndose una activación de 19% (Tabla XIII).

3.d.- Actividad de Uro-D de mezclas de preparaciones de hígados normales y porfíricos.

Los hígados de ratas fueron homogeneizados y pasados por columna de Sephadex G-25 de la misma forma que en el tópicó c).

El volumen incubado fué de 2 ml tanto para los ensayos de ratas normales, tratadas, como así también para los cruzados.

Los valores de observado, esperado si fuese aditivo y activación se interpretan igual que en a). En la Tabla XIV los nmoles de F + H + P + C formados / mezcla de reacción para el ensayo cruzado son mayores que los nmoles de F + H + P + C esperados/mezcla de reacción si fuese aditivo siendo este valor 107% de lo esperado. Esto implica que no existe inhibición de la enzima normal por el sobrenadante porfírico.

En la Tabla XV se puede observar la 2a. etapa de descarboxila-

TABLA XIII. ACTIVIDAD DE PORFEBILINGENASA DE MEZCLAS DE PREPARACIONES DE HIGADOS NORMALES Y PORFIRICOS.

VOLUMEN INCUBADO
 SOBRENADANTE DE
 HOMOGENATO PASA-
 DO POR SEPHADEX G-25

P C R F O B I L I N O G E N A S A

N	HCB	ESPERADO		OBSERVADO	ACTIVACION
		OBSERVADO	SI FUESE ADITIVO		
1	-	0.80			
-	1	1.05			
1	1	2.21	1.85	119	19%

La mezcla de reacción contenía 20×10^{-3} mM de PBG, 7 mg de proteína para los ensayos de animales normales (N) e intoxicados (HCB) por separado y 14 mg de proteína para los que contenían ambas preparaciones enzimáticas (N y HCB). La incubación se realizó como se detalla en Métodos.

TABLA XIV. ACTIVIDAD DE URO-D DE MEZCLAS DE PREPARACIONES NORMALES Y PORFIRICAS (1A. ETAPA).

VOLUMEN INCUBADO		U R O - D	
SOBRENADANTE DE		-	
HOMOGENATO PASA-		D	
DO POR SEPHADEX G-25			
N	HCB	ESPERADO OBSERVADO	OBSERVADO
		SI FUESE ADITIVO,	
INHIBICIÓN			
ML		NMOLES DE F+H+P+C FORMADOS/ / MEZCLA DE REACCION	% DE LO ESPERADO,
2	-	7.56	
-	2	2.14	
1	1	5.20	107
		4.85	-

La mezcla de reacción contenía 2.2 µM de Uro'gen III, 15 mg de proteína para los ensayos de animales normales (N) e intoxicados (HCB) por separado y 15 mg de proteína para los que contenían ambas preparaciones enzimáticas (N y HCB). La incubación se realizó como se detalla en Métodos.

TABLA XV. ACTIVIDAD DE URO-D DE MEZCLAS DE PREPARACIONES
NORMALES Y PORFIRICAS (2A. ETAPA).

VOLUMEN INCUBADO		U R O - D	
SOBRENADANTE DE HOMOGENATO PASA- DO POR SEPHADEX G-25			
N	HCB	OBSERVADO	ESPERADO SI FUESE ADITIVO
		OBSERVADO	
		INHIBICIÓN	
ML		NMOLES DE COPRO FORMADOS / / MEZCLA DE REACCIÓN.	% DE LO ESPERADO.
2	-	4.80	
-	2	0.22	
1	1	2.35	2.5 94 6

La mezcla de reacción y la incubación se realizó como en la Tabla XIV.

ción de Uro-D, la formación de Copro. El análisis es el mismo que para la Tabla anterior observándose aquí una inhibición del 6% lo cual no es significativo.

Conclusiones.

El agregado de una preparación enzimática de hígado porfírico sin calentar sobre una preparación enzimática normal no tiene acción sobre las enzimas ALA-S y ALA-D. No ocurre lo mismo con la PBG-asa. En éste el agregado de una preparación enzimática porfírica a una preparación enzimática normal produce una activación de la enzima normal correspondiente a un 19% (Tabla XIII). En cuanto a la Uro-D no se produce inhibición de la 1a. etapa de la enzima normal por el agregado de la preparación porfírica (Tabla XIV). La 2a. etapa de descarboxilación de esta enzima presenta una pequeña inhibición de la enzima normal al agregar la preparación porfírica la cual no es significativa.

4.- EFECTO DEL AGREGADO DE HCB Y PCF "IN VITRO" SOBRE LAS ACTIVIDADES DE DISTINTAS ENZIMAS DE HIGADO NORMAL.

Los ensayos con sobrenadantes desproteinizados de hígados porfíricos sobre sobrenadantes de hígado normal (Tópico 2) indicaban la existencia de un activador para la PBG-asa y un inhibidor para la Uro-D. Los ensayos con sobrenadantes sin calentar de hígados porfíricos sobre sobrenadantes normales (Tópico 3) indicaban la existencia de un activador para la PBG-asa. Se quiso por lo tanto investigar si el HCB o su metabolito (PCF), era el responsable de la activación o inhibición de

estas enzimas (PBG-asa y Uro-D). Para completar este estudio se investigó también el efecto de ambas drogas sobre ALA-S y ALA-D.

4.a.- Efecto del agregado de las drogas sobre la actividad de ALA-S.

Se homogeneizó e incubó hígado normal para determinar actividad de ALA-S según se detalla en Métodos. Al medio de incubación se adicionó PCF purificado en concentraciones que van entre 10^{-6} y 10^{-2} M. En otros ensayos se adicionó HCB purificado en concentraciones de 10^{-3} y 10^{-2} M. Estas drogas se disolvieron en benceno y se pipetearon volúmenes entre 0.4 y 0.04 en los tubos a incubar, el día anterior, para permitir que se evapore el solvente. Se adicionaron todos los reactivos del medio de incubación sobre el HCB o PCF seco,

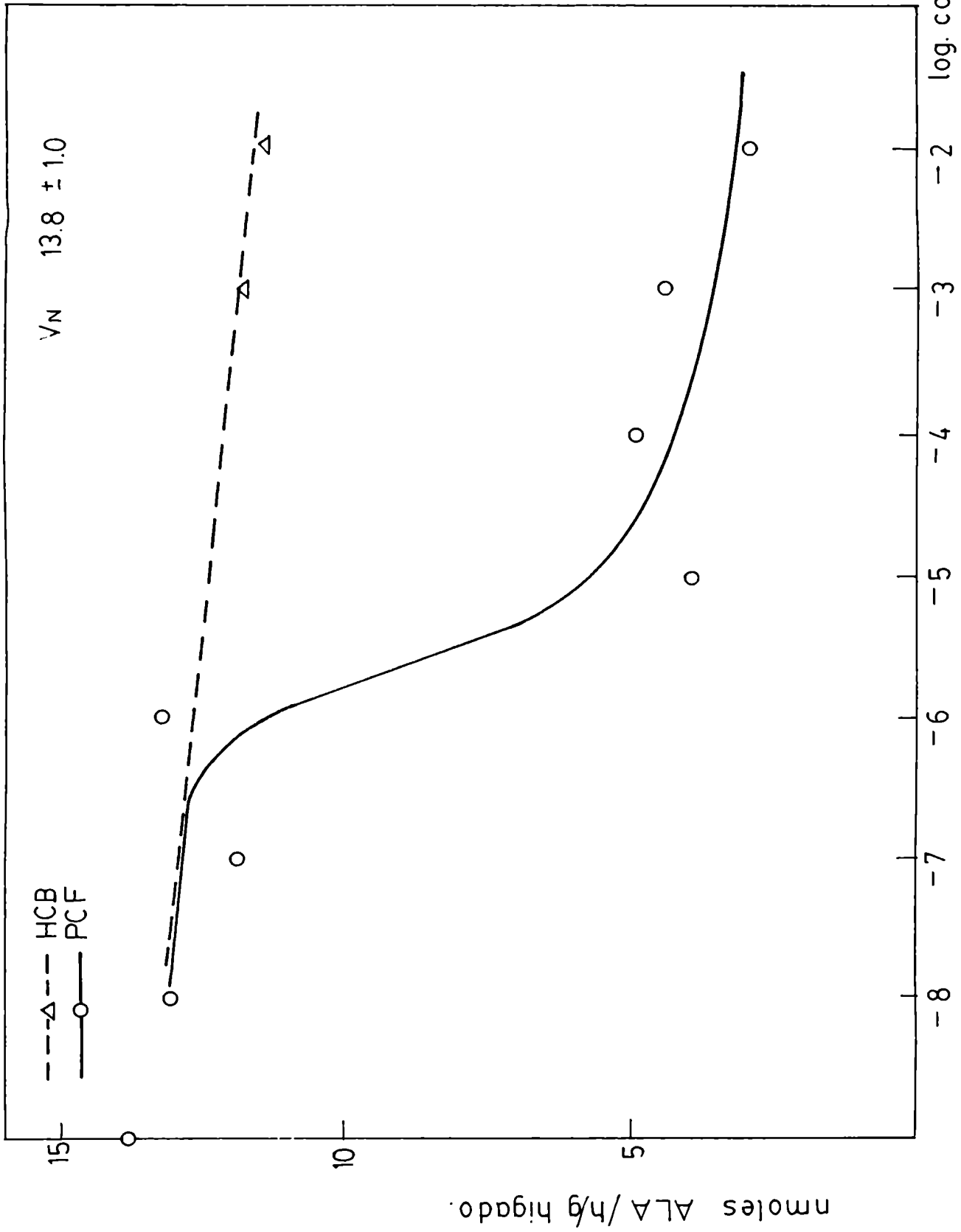
En la Fig. 45 se observa graficado los nmoles ALA/h/g hígado en función del log de las concentraciones de PCF y HCB,

El PCF no tiene efecto sobre esta enzima a concentraciones de 10^{-6} M o menores. A una concentración de 10^{-5} M hay una caída brusca en la actividad de esta enzima para mantenerse, luego con una leve caída de actividad hasta 10^{-2} M, Adicionando esta última concentración al medio de incubación la enzima decae su actividad en un 79%. Cuando se adiciona HCB al medio de incubación en concentraciones de 10^{-3} y 10^{-2} M la actividad de la enzima cae dentro del rango normal (Fig. 45).

4.b.- Efecto del agregado de las drogas sobre la actividad de ALA-D.

El homogenato, centrifugación e incubación para determinar la actividad de esta enzima se realizó como se indica en Métodos. Se

Fig. 45 EFECTO IN VITRO DE HCB Y PCF SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALA-S DE HIGADO NORMAL.



Los valores representan promedios de 4 determinaciones. La actividad de ALA-S se mide como se indica en Métodos. Las concentraciones de HCB y PCF adicionadas se indican en la Fig. El valor sobre ordenada representa el control sin la adición de drogas.

pipeteó PCF en concentraciones entre 10^{-6} y 10^{-2} M en el medio de incubación; y HCB en concentraciones de 10^{-3} y 10^{-2} M. La disolución y la forma de pipetear fué igual que en a), En la Fig. 46 se graficaron los nmoles de PBG/h/mg prot., en función del log. de la concentración de PCF y HCB. La actividad presenta valores normales hasta la adición de 10^{-5} M en PCF en el medio de incubación, Con la adición de 10^{-4} M de PCF hay un decremento de la actividad del 18% mientras que con la adición de 10^{-3} M de PCF hay un decremento brusco llegando a un 95% de inhibición cuando se adiciona 10^{-2} M de PCF, La adición de HCB no modifica la actividad de esta enzima.

4.c.- Efecto del agregado de las drogas sobre la actividad de PBG-asa.

El homogenato, centrifugación e incubación se realizó como se detalla en Métodos. Las concentraciones de PCF en el medio de incubación fueron entre 10^{-6} y 10^{-2} M, y las de HCB de 10^{-3} y 10^{-2} M.

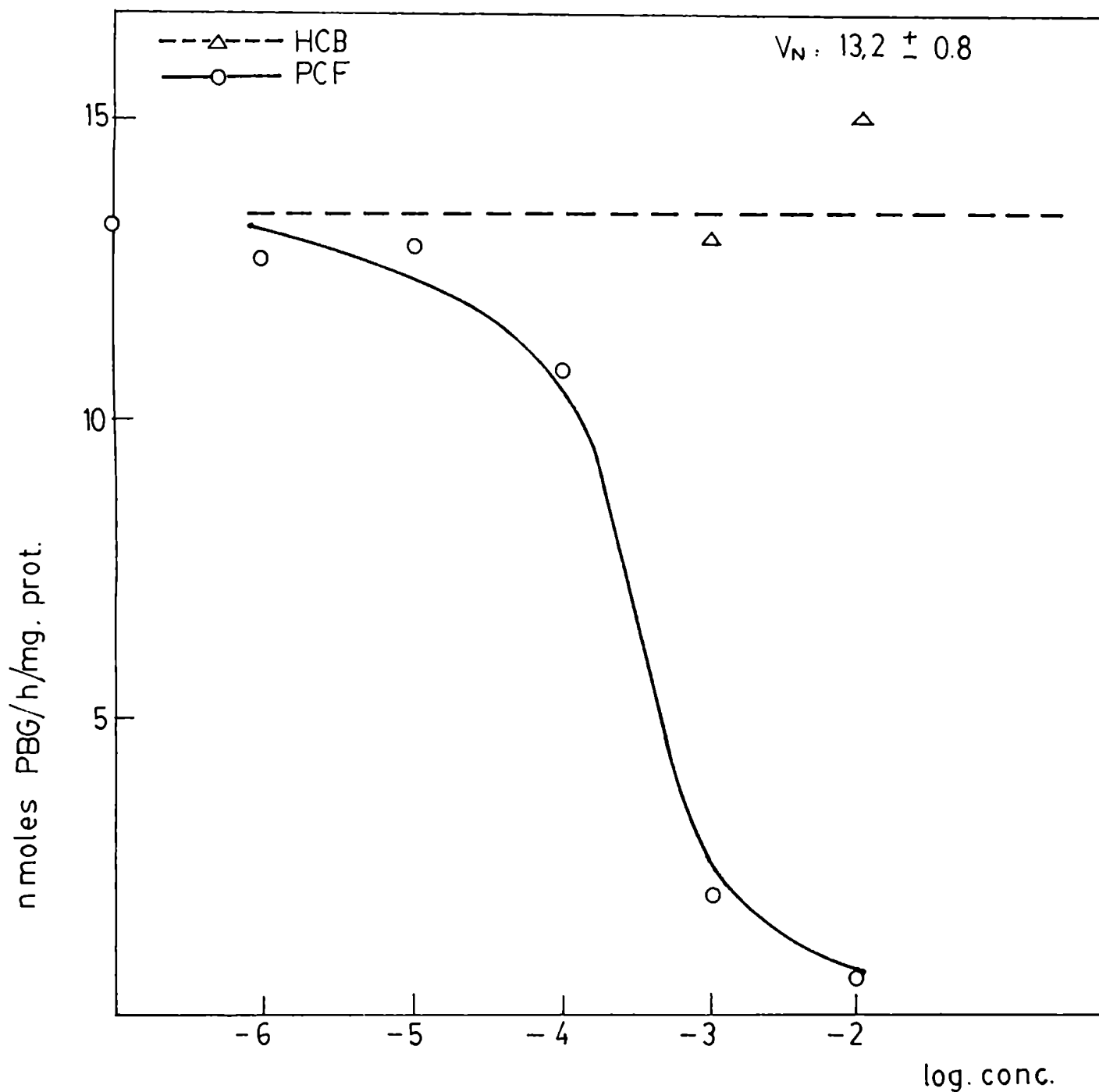
Como se ve en la Fig. 47 para esta enzima se obtienen valores normales aún con la adición de 10^{-3} M de PCF en el medio de incubación. Recién al adicionar una concentración de PCF de 10^{-2} M hay una caída brusca de actividad calculandose un 82% de inhibición. La adición de HCB tampoco modifica la actividad de esta enzima.

4.d.- Efecto del agregado de las drogas sobre la actividad de Uro-D.

El homogenato, centrifugación e incubación se realizó como se detalla en Métodos. Las concentraciones de PCF en el medio de incubación fueron entre 10^{-5} y 10^{-2} M y las de HCB de 10^{-3} y 10^{-2} M.

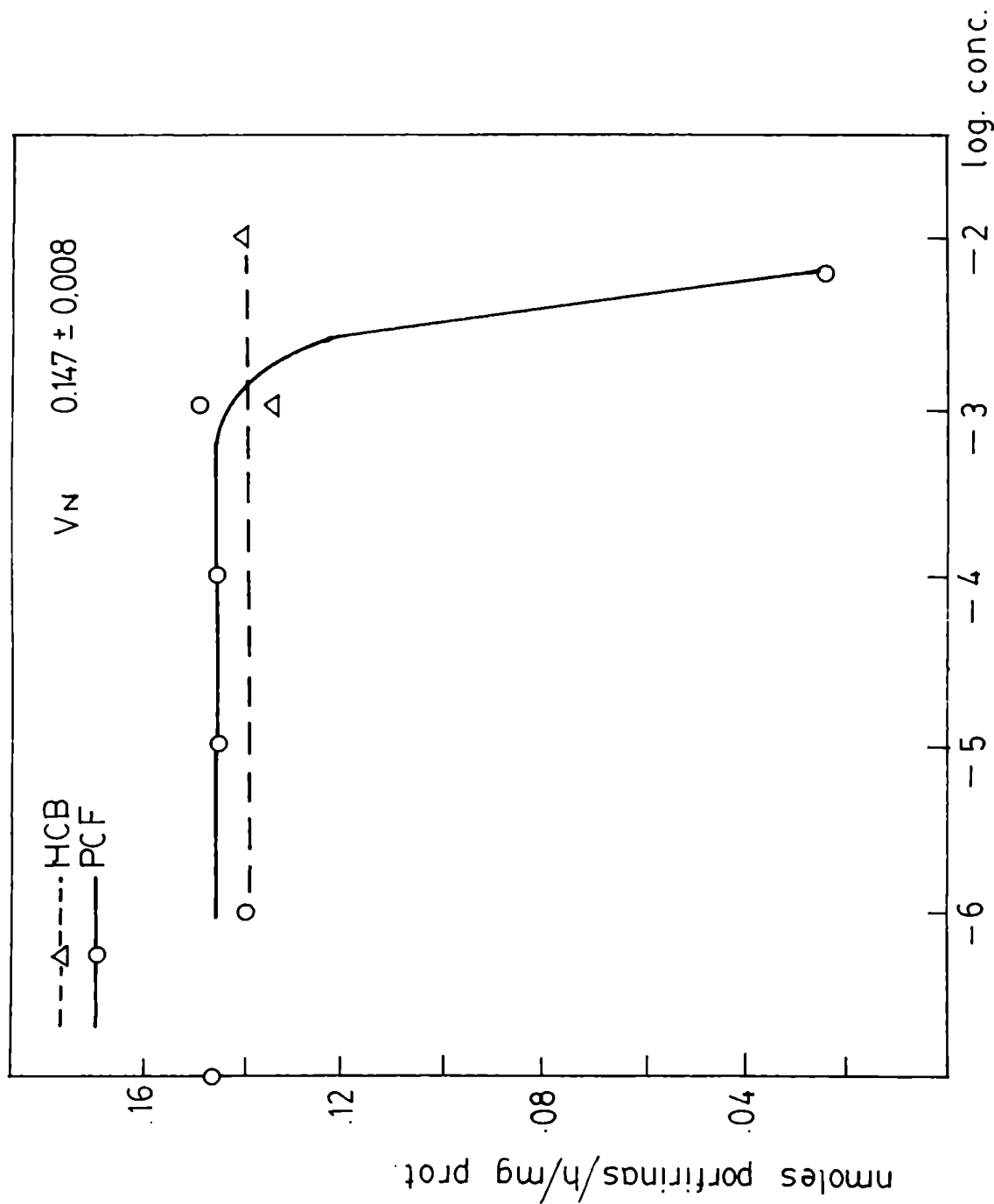
En la Fig. 48 se grafica los nmoles de porfirinas/mg proteína/ 30 min en función del log. de la concentración de las drogas. Se

Fig. 46 EFECTO "IN VITRO" DE HCB Y PCF. SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALA-D DE HIGADO NORMAL.



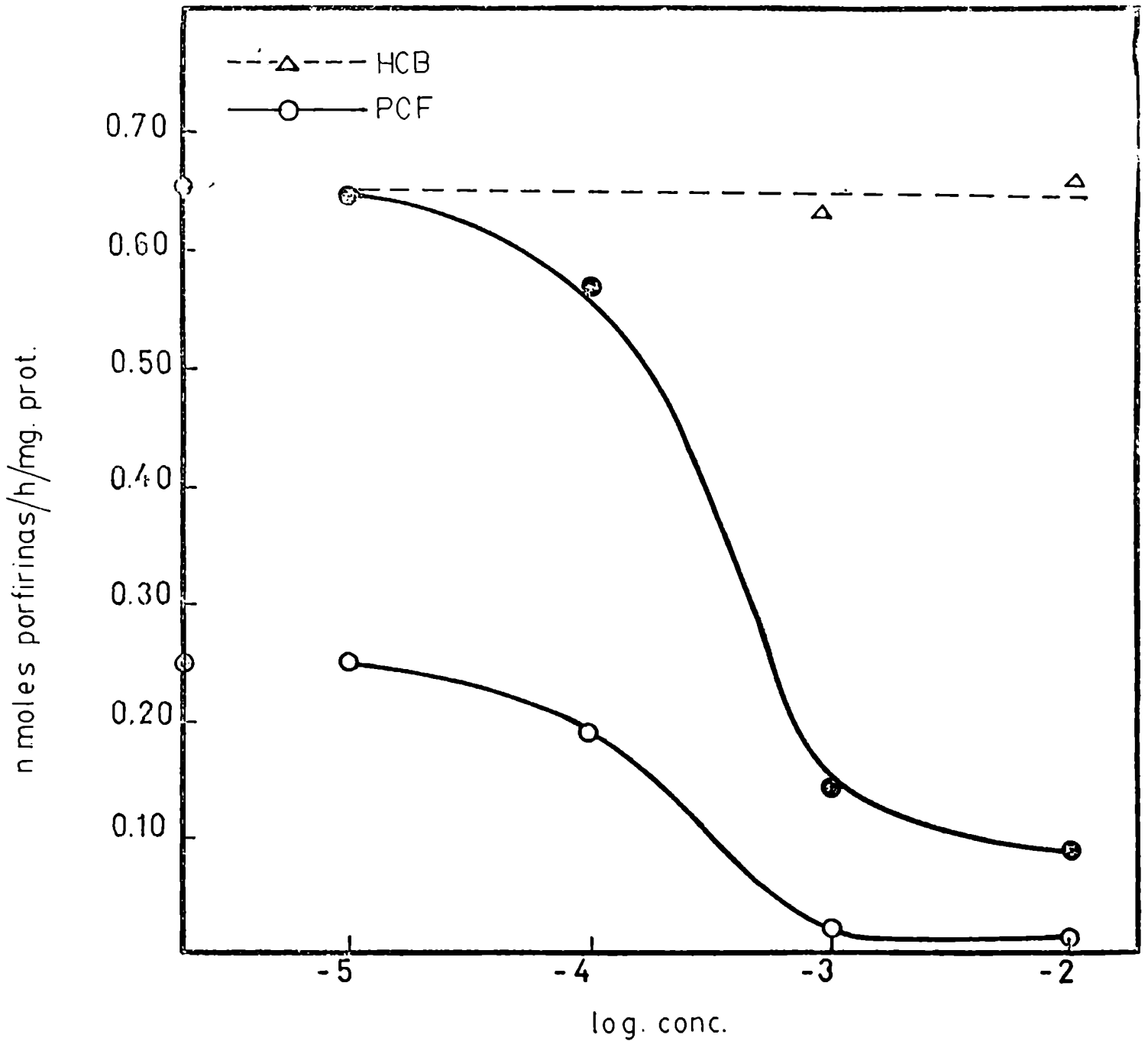
Los valores representan promedios de 4 determinaciones. La actividad de ALA-D se mide como se indica en Métodos. Las concentraciones de HCB y PCF adicionadas se indican en la Fig. El valor sobre la ordenada representa el control sin la adición de drogas.

Fig. 47 EFECTO "IN VITRO" DE HCB Y PCF SOBRE LA ACTIVIDAD DE PBG-ASA DE HIGADO NORMAL.



Los valores representan promedios de 5 determinaciones. La actividad de PBG-asa se mide como se indica en Métodos. Las concentraciones de HCB y PCF adicionadas se indican en la Fig. El valor sobre la ordenada representa el control sin la adición de drogas.

48 EFECTO IN VITRO DE HCB Y PCF SOBRE LA ACTIVIDAD DE URO-D DE HIGADO NORMAL.



Los valores representan promedios de 3 determinaciones. La actividad de Uro-D se mide como se indica en Métodos. Las concentraciones de HCB y PCF adicionadas se indican en la Fig. El valor sobre la ordenada representa el control sin la adición de drogas.

observa que las actividades de ambas etapas de descarboxilación poseen valores normales cuando en el medio de incubación existe una concentración de PCF de 10^{-5} M. Cuando la concentración de PCF aumenta en el medio de incubación la actividad de la enzima disminuye llegando a valores cercanos a un 100% de inhibición para la 2a. etapa cuando en el medio de incubación hay concentraciones de 10^{-3} y 10^{-2} M en PCF. El HCB, en cambio, no altera la actividad de la enzima aún a concentraciones de 10^{-3} y 10^{-2} M en el medio de incubación.

Conclusiones.

Se observa que el HCB no modifica la actividad de ALA-S, ALA-D, PBG-asa y Uro-D a ninguna de las concentraciones ensayadas mientras que el PCF disminuye la actividad de las cuatro enzimas. Es decir produce inhibición, aunque las concentraciones inhibitorias son distintas para cada enzima. Así la concentración mínima inhibitoria (donde comienza a verse el efecto inhibitorio) para ALA-S es de 10^{-5} M, para ALA-D y Uro-D 10^{-4} M, y para PBG-asa 10^{-2} M. Vemos además que a una concentración de PCF de 10^{-5} M la única que se ve inhibida es la ALA-S mientras que están inalteradas la ALA-D, PBG-asa y Uro-D.

A 10^{-2} M (concentración de PCF que afecta a las cuatro enzimas) se observa que los porcentajes de inhibición son 79% para ALA-S, 95% para ALA-D, 82% para PBG-asa y 93% para la 2a. etapa de Uro-D, es decir que las más inhibidas son Uro-D y ALA-D, le sigue PBG-asa y luego ALA-S.

Es decir que a concentraciones bajas la más sensible es ALA-S y a concentraciones altas las más sensibles son Uro-D y ALA-D

De todos modos ni HCB ni PCF producen activación de ALA-S, ALA-D y PBG-asa. La enzima Uro-D no presenta inhibición por HCB. En cambio el PCF produce inhibición de la misma a concentraciones de 10^{-4} M. A concentraciones de 10^{-3} M la inhibición producida por esta droga supera a la disminución de actividad observada "in vivo".

III

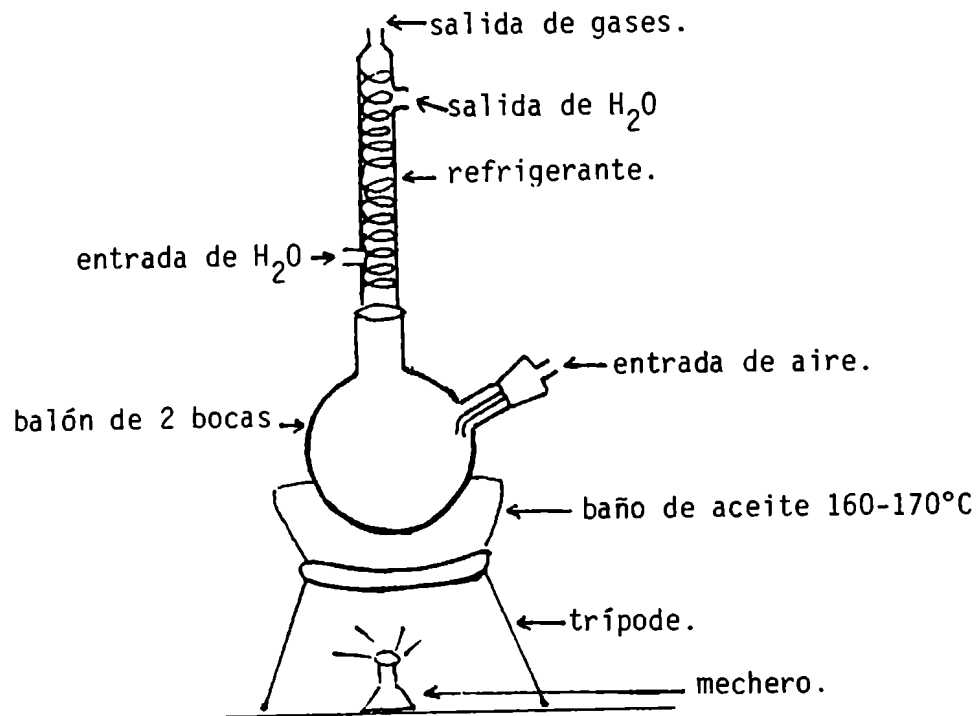
ADMINISTRACION "IN VIVO" DE PCF A RATAS Y A

EMBRIONES DE POLLO,

1. Obtención de PCF purificado a partir de PCF técnico 60%.

Para poder obtener PCF purificado a partir de PCF técnico se emplearon distintos Métodos.

1.a. Se conoce que el punto de fusión del PCF es 188°C - 189°C . La mayor impurificación que posee es el 2, 3, 4, 6 tetraclorofenol con un punto de fusión de 69°C - 70°C . Como estos dos puntos de fusión eran muy distintos se intentó realizar la purificación por sublimación. Para ello se diseñó el siguiente aparato.



Se colocó PCF técnico en el balón, se calentó el baño de aceite a 160 - 170°C . Se obtuvo depositado en el refrigerante un compuesto blanco con un punto de fusión que correspondía al tetraclorofenol, y un rendimiento

muy bajo. En la parte inferior del balón se forma una pasta dura negra muy difícil de sacar. El PCF queda retenido con esta impureza. Por lo tanto no se pudo purificar el PCF por esta metodología.

1.b. Se trató de purificar por sucesivas recristalizaciones de benceno caliente. Se partió de 400 g de PCF técnico, se disolvió en 1L. de benceno caliente. Se enfrió a temperatura ambiente y luego en hielo y se filtró por Buchner quedando un precipitado blanco. Al realizar la 2a. recristalización quedó retenida en el filtro una sustancia negra alquitranosa, quedando en la solución dentro del kitasato el precipitado blanco correspondiente a PCF. Se siguió trabajando con esta solución que estaba en el kitasato. Esta solución se enfrió y se filtró, obteniéndose un precipitado más blanco que el anterior. Se realizaron 4 recristalizaciones para eliminar toda la impureza alquitranosa. Luego se llevaron a cabo 2 recristalizaciones más, obteniéndose un punto de fusión entre 180°C y 185°C. Este PCF se utilizó luego como PCF purificado para realizar los experimentos.

2. Dosis y tiempos requeridos para producir intoxicación con PCF técnico y purificado.

Se comenzó a drogar un grupo de 3 ratas con PCF técnico con una dosis 400 mg/kg de peso de rata/día, y otro grupo de 3 ratas con una dosis de 200 mg/kg peso de rata/día. El PCF se suspendió en H₂O agregándose previamente unas gotas de Tween 20 tratando de realizar una suspensión con la ayuda de un mortero. La administración de esta droga fué con sonda gástrica. Los animales se mantuvieron en jaulas metabólicas para recoger orina, observar las bandas y realizar las deter-

minaciones de ALA, PBG y porfirinas con columnas Dowex 1 y Dowex 50. De los animales del 1er. grupo (drogados con 400 mg/kg) 2 murieron a las 2 hs. y el tercero a los 3 días. De los animales del 2º grupo (drogados con 200 mg/kg) 1 murió a las 2 horas, otro a los 4 días y el otro a los 3 meses. No se observó excreción de porfirinas en orina, ni acumulación en hígado en ninguno de estos animales.

Se comenzó luego a drogar otro grupo de animales con una dosis de 50 mg/kg de peso/día. De estos 1 sólo murió después de 3 meses de drogado no habiendo excreción de porfirinas. En los otros 2 animales se pudieron observar bandas características de porfirinas después de 5 meses de intoxicación.

Se trabajó con otros 2 lotes de animales los cuales se comenzaron a drogar con 70 mg/kg de peso y 90 mg/kg de peso respectivamente. Después de 2 meses de drogado se comenzó a notar un aumento de la cantidad de porfirinas en algunas de las ratas de estos lotes, cuando se realizaron las determinaciones con columnas de intercambio iónico. Es de hacer notar que en estos animales drogados y en sus respectivos controles, se realizaba 1 vez por semana las determinaciones ALA, PBG y porfirinas en orina.

Con todos estos ensayos previos se construyó un esquema definitivo para la intoxicación de ratas con PCF técnico.

El PCF técnico se suspendió en agua (4.2 mg/ml) con la ayuda de Tween 20 (0.7 ml/100 ml de suspensión), dándolo a los animales a través de sonda gástrica. Las ratas recibieron dosis de 45-55 mg/kg/día durante el primer mes y luego la dosis fué incrementada a 70-90 mg/kg/día

durante el resto de tiempo hasta adquirir una porfiria definida.

El esquema de drogado con PCF purificado fué: 110-140 mg/kg/día para el primer mes; 170-195 mg/kg/día durante el segundo mes y 195 mg/kg/día durante los siguientes 4 meses.

3. Determinación de distintos parámetros en ratas normales e intoxicadas con PCF técnico y purificado.

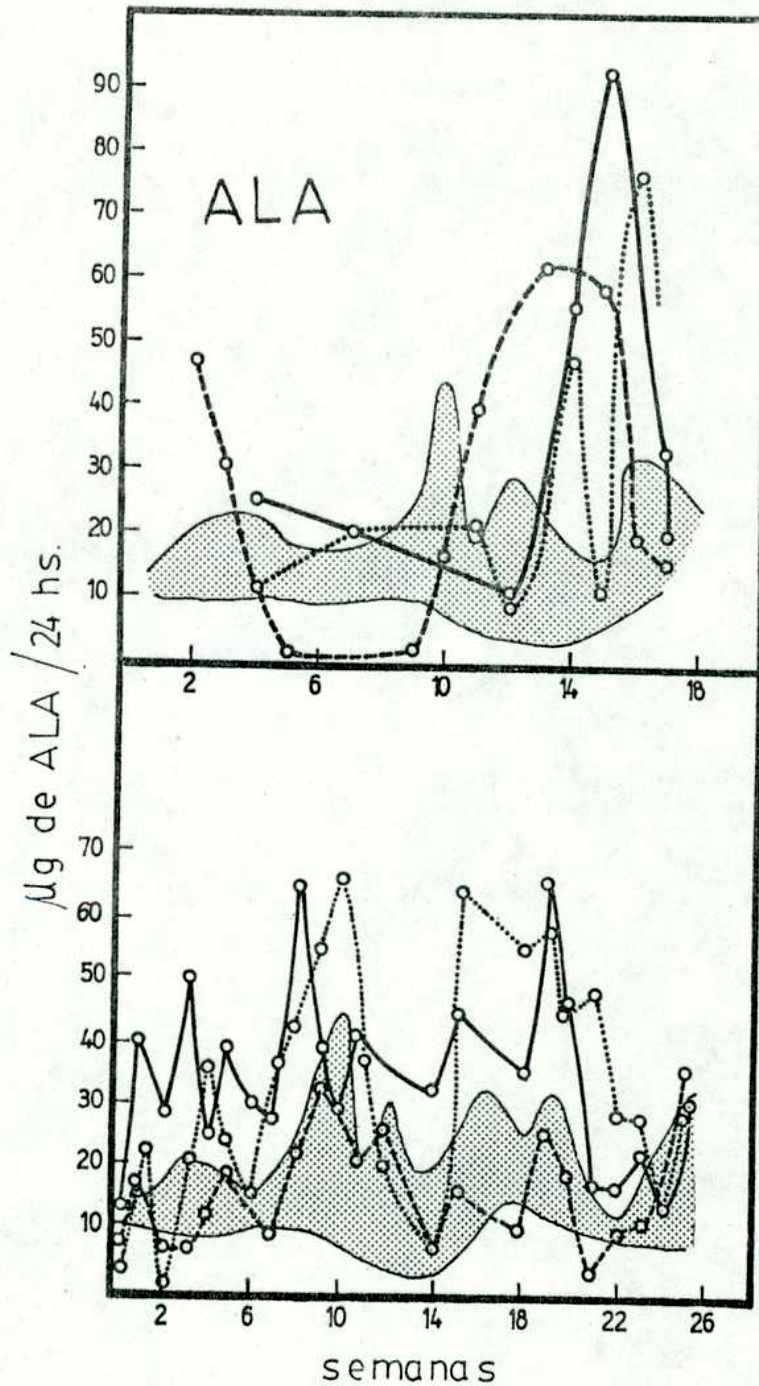
3.a. Excreción de ALA, PBG y porfirinas en orina de ratas tratadas con PCF técnico y purificado.

Se apartó un lote de 18 ratas Wistar de aproximadamente 180 g de peso y se lo dividió en 3 grupos; (1) normal, (2) ratas tratadas que recibían PCF técnico, (3) ratas tratadas que recibían PCF purificado.

Se realizaron los análisis de ALA, PBG y porfirinas en orina de 24 hs semanalmente durante un período de 18 semanas para el grupo 2 y de 25 semanas para el grupo 1 y 3. El análisis de precursores y porfirinas se realizó como se detalla en Métodos. Este experimento fué repetido 2 veces.

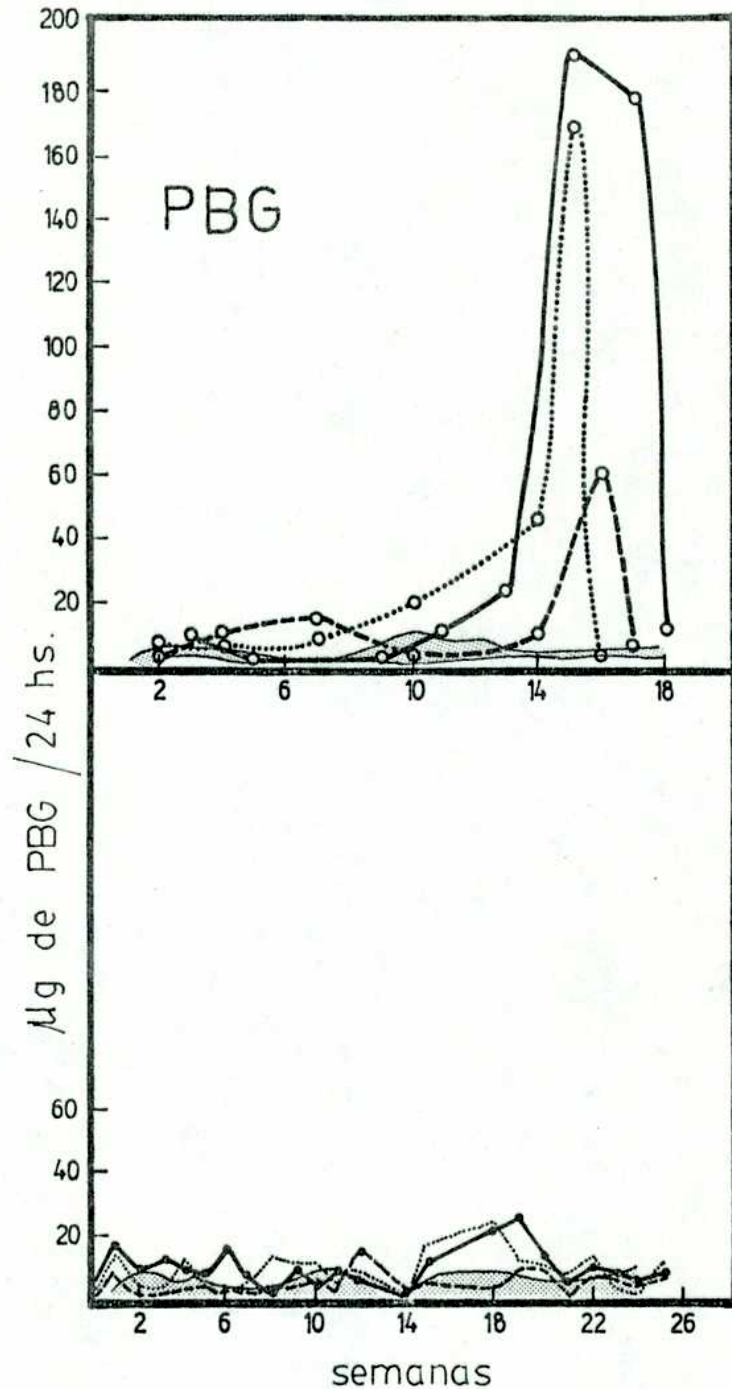
Las Figs. 49, 50 y 51 muestran los resultados obtenidos expresados como ug/24 hs en función del tiempo de intoxicación en semanas. En la parte superior de las figuras se pueden observar los gráficos correspondientes a intoxicación con PCF técnico, donde se ve que las ratas adquieren porfiria después de 3 meses de intoxicación. Después de este tiempo los niveles de ALA, PBG y porfirinas urinarias incrementan rápidamente llegando a valores máximos después de 15-16 sema-

Fig 49 EXCRECION URINARIA DE ALA.



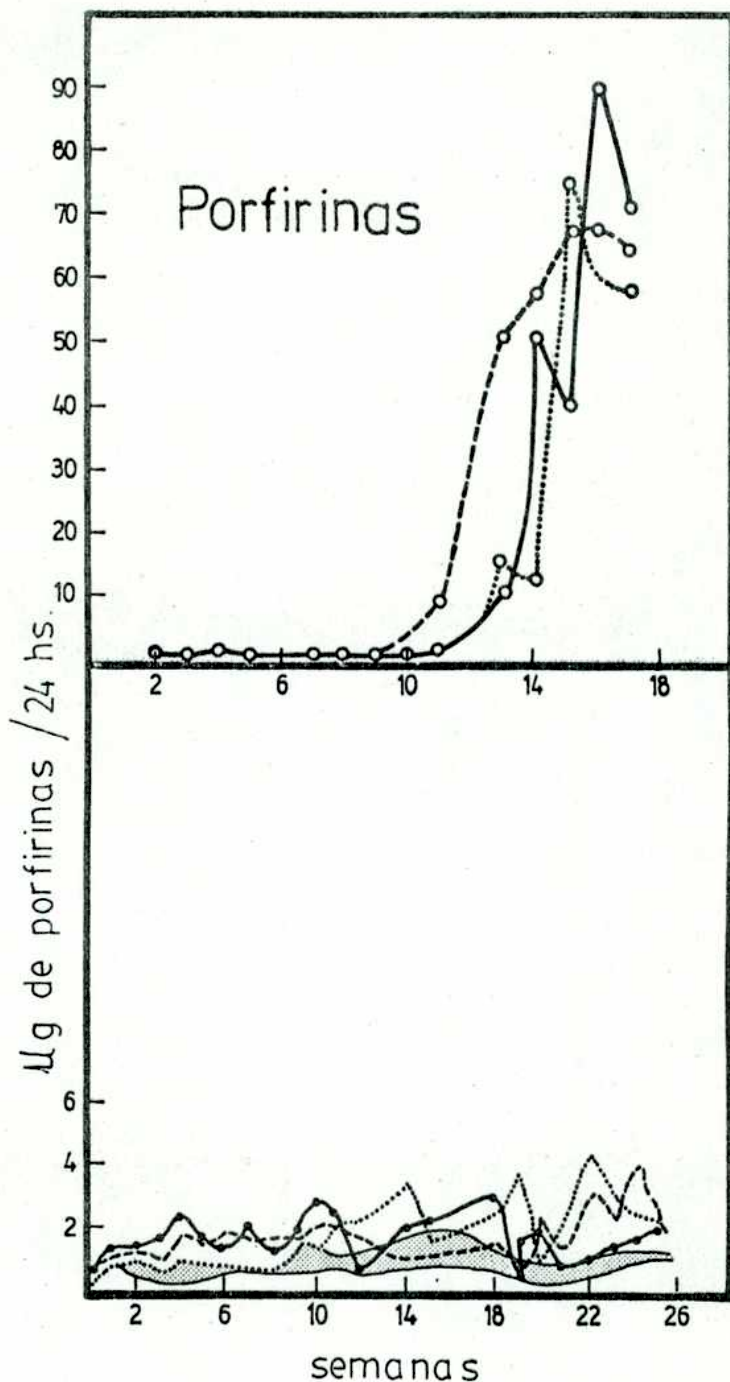
Parte superior de la Fig: Animales intoxicados con PCF técnico.
Parte inferior de la Fig: Animales intoxicados con PCF purificado. El área sombreada representa el rango de valores normales. Cada línea representa la excreción urinaria individual de una representativa rata tratada. Las determinaciones se realizan como se indica en Métodos.

Fig. 50 EXCRECION URINARIA DE PBG



Parte superior de la Fig: Animales intoxicados con PCF técnico. Parte inferior de la Fig: Animales intoxicados con PCF purificado. El área sombreada representa el rango de valores normales. Cada línea representa la excreción urinaria individual de una representativa rata tratada. Las determinaciones se realizan como se indica en Métodos.

Fig. 51 EXCRECION URINARIA DE PORFIRINAS



Parte superior de la Fig: Animales intoxicados con PCF técnico. Parte inferior de la Fig: Animales intoxicados con PCF purificado. El área sombreada representa el rango de valores normales. Cada línea representa la excreción urinaria individual de una representativa rata tratada. Las determinaciones se realizan como se indica en Métodos.

nas de tratamiento, La excreción de ALA y PBG decrece luego mientras que la excreción de porfirinas permanece elevada. El incremento en la excreción de porfirinas es el signo más consistente de porfiria y es más alto que los correspondientes a ALA y PBG. La excreción de ALA se eleva 5 veces como máximo ($94 \mu\text{g}/\text{día}$ vs $19.08 \pm 5.05 \mu\text{g}/\text{día}$ para normales), PBG se eleva 44 veces ($192 \mu\text{g}/\text{día}$ vs $4.41 \pm 0.45 \mu\text{g}/\text{día}$ para normales), y porfirinas 140 veces ($90 \mu\text{g}/\text{día}$ vs $0.65 \pm 0.11 \mu\text{g}/\text{día}$ para normales).

Las porfirinas excretadas por orina de ratas normales e intoxicadas con PCF fueron secadas, esterificadas y cromatografiadas determinándose que la mayor porfirina excretada en ratas normales es Copro siendo su % de excreción del 95% mientras que en las ratas intoxicadas el cuadro de excreción es: URO (55%); porfirinas de 5 y 6-COOH (8%); FIRIA (12%) y COPRO (25%).

Las ratas tratadas con PCF purificado (Figs. 49, 50 y 51 parte inferior) no desarrollan porfiria, a pesar de haber recibido un tratamiento mucho más prolongado y mayor concentración de droga. Los valores de ALA, PBG y porfirinas de las ratas tratadas se apartan de los normales pero los animales no llegan a adquirir estado de porfiria.

3.b. Contenido de porfirinas en diversos tejidos de ratas normales e intoxicadas.

Los animales intoxicados con PCF técnico son sacrificados junto con sus respectivos controles normales después de 18 semanas de tratamiento y los tratados con PCF purificado después de 26 semanas de

tratamiento.

Después de extraerles los distintos órganos se determina el contenido de porfirinas como se indica en Métodos. Los resultados de la Fig. 52 muestran de que el PCF técnico produce un incremento en el contenido de porfirinas en el bazo, riñón e hígado, en este orden, siendo el aumento mayor el del hígado ($970 \pm 151 \mu\text{g/g}$ tejido). Los valores promedios de hígado, riñón, bazo son respectivamente 713, 13 y 6.7 veces mayores en animales porfíricos que en normales. La droga técnica incrementa también los niveles de porfirinas del intestino, el cual presenta fluorescencia roja, así como también el de los huesos.

Al estudiar la naturaleza de las porfirinas (Tabla XVI) se observó que en hígado, bazo y riñón normal hay pequeñas cantidades de Copro y Proto; mientras que en riñón normal también se detectan trazas de Uro y Firia. En contraste, en todos estos órganos el PCF técnico produce una acumulación de porfirinas que consiste solo en Uro y Firia, Copro y Proto no se detectan. La relación de Uro a Firia es 74:26 en el hígado, 78:22 en el riñón y 82:18 en el bazo.

El tratamiento con PCF purificado (Fig. 52) no modifica la acumulación de porfirinas en ninguno de los órganos estudiados, a pesar de haber realizado un tratamiento de más de 25 semanas.

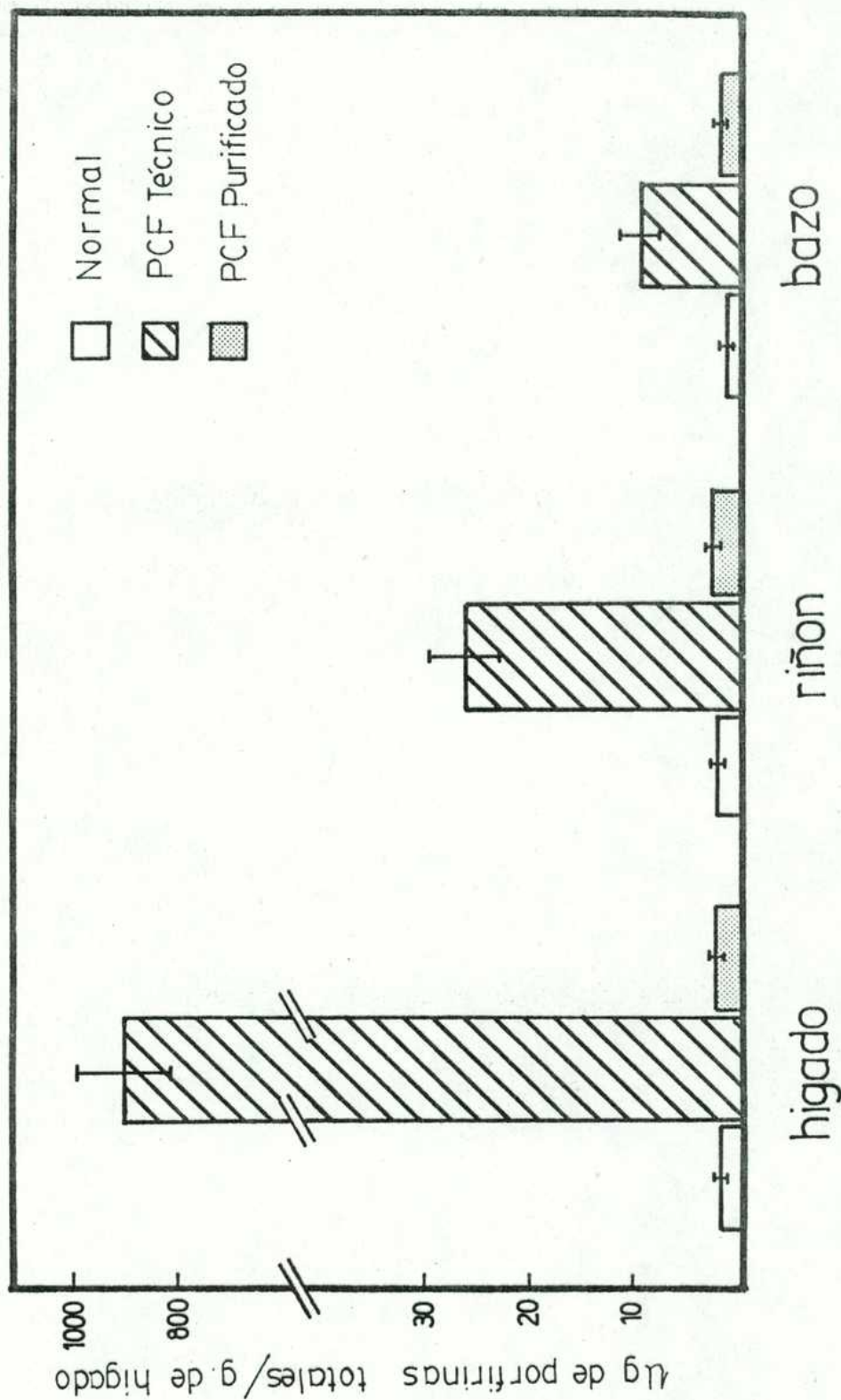
3.c. Actividad de ALA-S y Uro-D hepática en ratas normales y en ratas tratadas con PCF técnico y purificado. La actividad de ALA-S aumenta 2,5 veces (Fig. 53) en el hígado de ratas tratadas con PCF técnico. Los animales tratados con PCF purificado dan valores de actividad de ALA-S normales.

TABLA XVI. COMPOSICION CUANTITATIVA DE PORFIRINAS EN TEJIDOS DE RATAS NORMALES E INTOXICADAS CON PCF TECNICO.

TEJIDO	NATURALEZA DE PORFIRINAS (%)					
	8-COOH	7-COOH	6-COOH	5-COOH	4-COOH	2-COOH
					TRAZAS	TRAZAS
HIGADO						
NORMAL						
PCF	74±2	26±2	-	-	-	-
RIÑON						
NORMAL	TRAZAS	TRAZAS	-	-	TRAZAS	TRAZAS
PCF	78±2	22±2	-	-	-	-
BAZO						
NORMAL	TRAZAS	TRAZAS	TRAZAS	TRAZAS	TRAZAS	TRAZAS
PCF	82±7	18±7	-	-	-	-

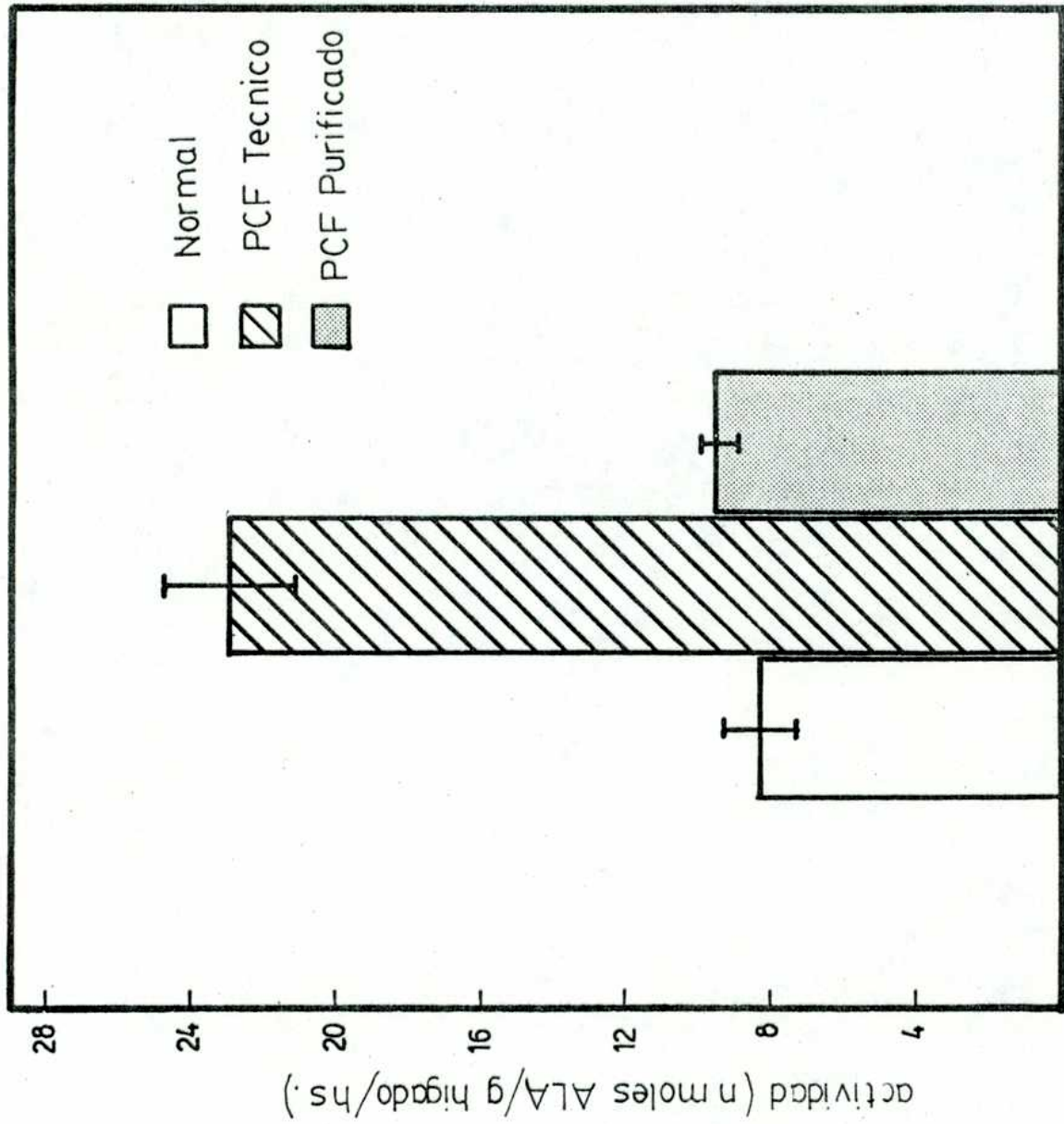
Los animales fueron tratados como en la Fig. 2. Las porfirinas fueron aisladas y cuantificadas como se indica en Métodos.

Fig. 52. EFECTO DEL PCF TECNICO Y PURIFICADO SOBRE LA ACUMULACION DE PORFIRINAS EN TEJIDOS DE RATAS.



Grupos de 6 ratas tratadas diariamente con PCF técnico o purificado fueron sacrificadas a las 18 y 25 semanas respectivamente. Los histogramas indican valores promedios - E.S.

Fig. 33 ACTIVIDAD DE ALA-S EN HIGADO DE RAIAS NORMALES E INTOXICADAS CON PCF TECNICO Y PURIFICADO.



La mezcla, condiciones de incubación y procedimiento se describen en Métodos. Los histogramas representan los promedios \pm F.S.

De las 12 ratas que se trataron con PCF técnico en 2 experimentos sucesivos, 10 se pusieron porfirricas o sea excretaban y acumulaban grandes cantidades de porfirinas, (grupo a). Las otras 2 ratas no respondieron, (grupo b) como se puede juzgar por los valores normales obtenidos para ALA, PBG y porfirinas urinarias, contenido de porfirinas en tejidos y actividad de ALA-S de hígado.

Se determinó la actividad de Uro-D en ambos grupos de animales. Los ensayos del grupo (a) se llevaron a cabo en sobrenadantes de 11.000 g de homogenatos de hígados pasados por columnas de Sephadex G-25 para separar la gran cantidad de porfirinas endógenas presentes.

Los resultados de la Tabla XVII muestran que la actividad enzimática decrece dramáticamente (75 y 98% respectivamente para la 1a. y 2a. etapa), al realizar el tratamiento con PCF técnico (grupo a).

Las ratas del grupo b exhiben un decremento de actividad de 18 y 33% respectivamente para ambos pasos de decarboxilación, mientras que mostraban valores normales de todos los demás parámetros,

Como se puede ver en la Tabla XVII el PCF purificado produce un muy leve decremento de la actividad de esta enzima, sólo un 10% para la primera etapa de decarboxilación.

En la parte izquierda de la Tabla XVII se ven los porcentajes de los distintos productos de decarboxilación y del sustrato remanente. Los resultados muestran de que sólo un 0.5% de Copro'gen se forma en los ensayos de actividad enzimática en los animales tratados con PCF técnico (grupo a) mientras que en los normales se forma un 18%. La proporción relativa de porfirinas de 6-COOH es mayor que la

TABLA XVII. EFECTO "IN VIVO" DE PCF TÉCNICO Y PURIFICADO SOBRE LA ACTIVIDAD DE URO-D HEPATICA.

PREPARACION	P O R F I R I N O G E N O S				ACTIVIDAD ESPECIFICA (NMOLES PORFIRINAS/MG PROT./ 30 MIN.)		
	SUSTRATO REMANENTE	PRODUCTOS FORMADOS		DESAPARICIÓN DE URO'GEN (PORFI- URINAS DE 7- +6- +5- +4-COOH).	DECRE- MENTO (%)	FORMACIÓN DE COPRO'GEN (FORFIRINAS DE 4-COOH).	DECRE- MENTO (%)
		3-COOH	7-COOH				
NORMAL	43±2	30±2	4.5±0.2	4.5±0.2	18±1	0.61±0.02	0.17±0.13
PCF TÉCNICO (A)	84±3	13±2	2±0.5	1±0.5	0.5±0.3	0.15±0.01	0.004±0.0003
PCF TÉCNICO (B)	43*	32*	5*	5*	15*	0.50*	0.20*
PCF PURIFICADO	45±2	30±1	4.5±0.2	4.5±0.2	16±1	0.55±0.03	0.15±0.02

(A) Ratas tratadas con PCF técnico que exhiben alta excreción y acumulación hepática de porfirinas.

(B) Ratas tratadas con PCF técnico que exhiben excreción y acumulación normal.

La Mezcla de incubación contiene: 2µM de Uro'gen III, 7-8 mg de proteínas de sobrenadantes de homogenato (11000g) de hígado normal o de ratas intoxicadas con PCF técnico (b) o PCF purificado o de sobrenadante de homogenato de 11000 g pasado por columna de Sephadex G-25 en ratas intoxicadas con PCF técnico (a).

Los resultados se expresan como promedios - E.S. *Estos resultados son el promedio de repetidas determinaciones en 2 animales.

de 5-COOH para el grupo a de ratas tratadas con PCF técnico. Toda esta serie de experimentos incluyendo estudios de excreción, acumulación y estimación de actividades enzimáticas fueron repetidos usando PCF técnico de otro origen (Compañía Química S.A.). Con ambos PCF técnico se obtuvieron resultados similares.

4. Efecto de PCF purificado en hígado de embrión de pollo.

4.a. Contenido de porfirinas en hígado de embrión de pollo inyectados con PCF purificado.

Con el objeto de determinar la respuesta de los embriones de pollo a la droga purificada, se inyectaron 23 embriones con 1, 2, 3, 5 y 10 mg/huevo de PCF purificado. La forma de inyección se detalla en Métodos,

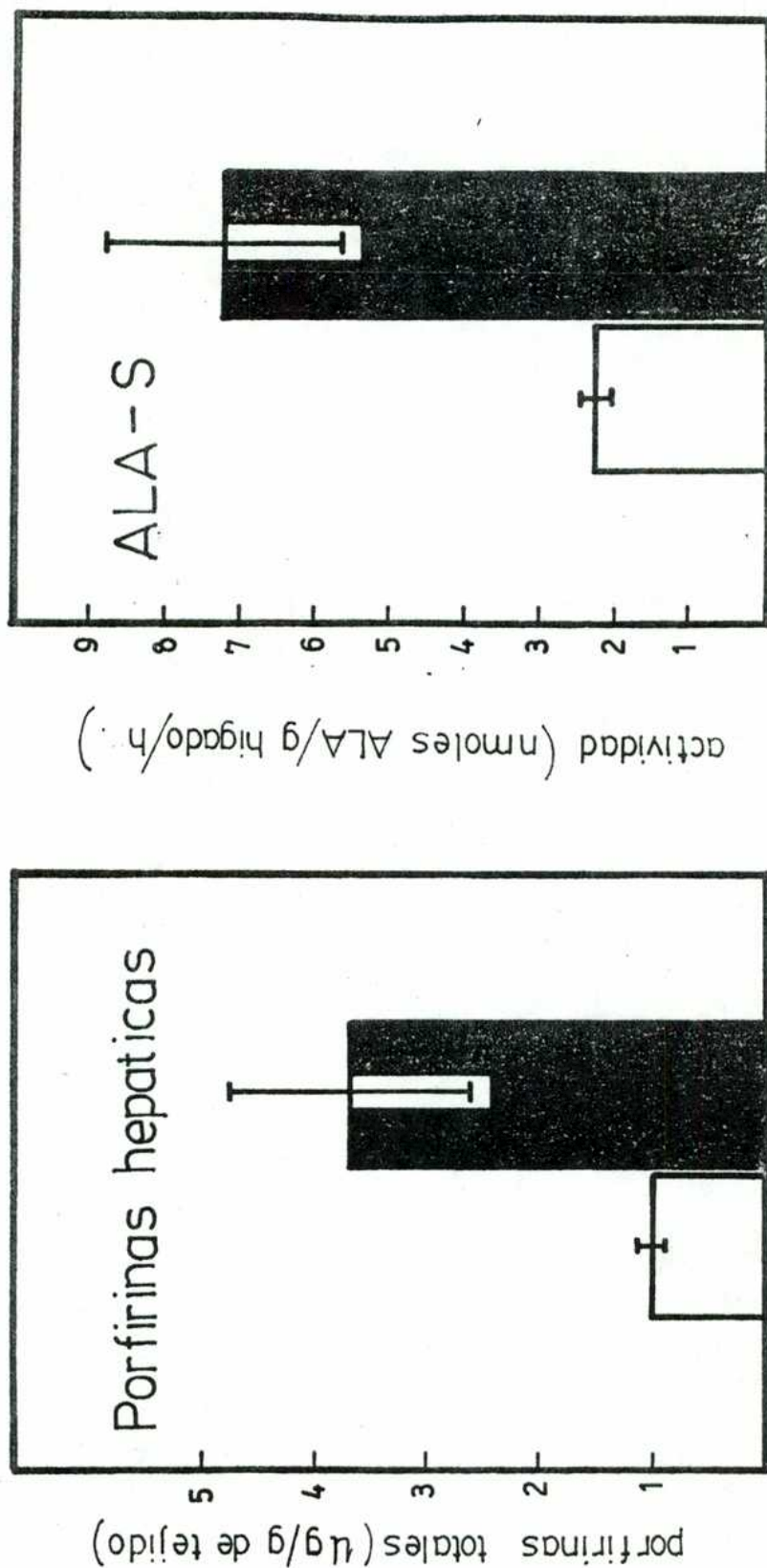
Los embriones de pollo son muy susceptibles a esta droga y sólo sobrevivieron 24 hs los inyectados con 1 mg de droga/huevo. Se observó una mayor acumulación de porfirinas que en los normales con todas las dosis ensayadas, pero en grados variables.

En la Fig. 54(a) se observa la acumulación de porfirinas en embriones inyectados con una dosis de 10 mg/huevo. El PCF purificado produce con esta dosis una significativa acumulación de porfirinas en el hígado. El valor promedio es 3.8 veces mayor que el control.

4.b. Actividad de ALA-S en hígado de embrión de pollo inyectado con PCF purificado.

Se estudió la actividad de ALA-S hepática en 25 embriones de pollo intoxicados y en sus respectivos controles. Se probaron dosis

Fig. 54. CONTENIDO DE PORFIRINAS Y ACTIVIDAD DE ALA-S EN HIGADOS DE EMBRION DE POLLO.



Los grupos controles (6 huevos para la determinación de porfirinas hepáticas (a) y 8 huevos para la determinación de actividad enzimática (b)) reciben sólo 0.2 ml de DMSO; el grupo tratado con PCF (6 huevos para (a) y 15 huevos para (b)) reciben 10 mg/huevo para (a) y 3 mg/huevo para (b). Los embriones se incuban a 38°C y después de 5 horas para (a) y 2 horas para (b) se sacrifican. Los hígados de cada embrión se ensayan separadamente. Los resultados se expresan como promedios - E.S.

de 1, 3 y 5 mg/huevo. Los embriones fueron sacrificados 2 hs. después de haber sido inyectados. Se eligieron estas dosis debido a que producen una buena respuesta y una mayor supervivencia de los animales. En la Fig. 54(b) se observa el incremento de la actividad de ALA-S hepática al inyectar una dosis de PCF purificado de 3 mg/huevo. La droga incrementa, en estas condiciones, 3,4 veces la actividad respecto a la enzima normal. Resultados similares se obtuvieron cuando los embriones fueron inyectados con dosis de 5 mg/huevo.

Conclusiones.

El PCF técnico produce:

1.- Incremento en los niveles de excreción de precursores y porfirinas en el siguiente orden: porfirinas > PBG > ALA. Los picos de excreción se encuentran aproximadamente entre la 15a. y 16a. semana de tratamiento.

2.- Se produce acumulación de porfirinas en hígado, riñón y bazo, siendo el que mas acumula el hígado obteniéndose un valor promedio de 970 $\mu\text{g/g}$, le sigue el riñón y luego el bazo.

3.- Incremento de ALA-S (2.5 veces) y drástico decremento (98%) de la Uro-D.

El PCF purificado, en ratas, no modifica significativamente los parámetros estudiados, mientras que en embriones de pollo produce aumento en la acumulación de porfirinas en hígado y en la actividad de ALA-S hepática.

IV. PAPEL DEL HIERRO EN LA PRODUCCION DE
PORFIRIA POR HEXACLOROBENCENO.

Dado los antecedentes detallados en la Introducción resultó interesante hacer un estudio químico detallado de los distintos tipos de Fe que pudieran estar alterados en el hígado por acción "in vivo" del HCB y tratar además de establecer si esas alteraciones estaban relacionadas de algún modo con las alteraciones provocadas por dicha droga sobre las enzimas del camino metabólico del hemo.

Para ello se realizaron los estudios que se detallan a continuación.

1.- CONTENIDO EN HIERRO TOTAL, HEMICO Y NO HEMICO EN HIGADO DE RATAS NORMALES Y EN INTOXICADAS CON HCB.

1.a.- Curvas de calibración: Para determinar las cantidades de los distintos tipos de hierro en cada una de las muestras se requirió, realizar previamente 3 curvas de calibración, que correspondieron a las determinaciones de Fe total, hémico y no hémico. Las metodologías empleadas se detallan en Métodos.

1.a₁.- Fe total.

Se preparó una solución patrón con $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Mallinckrodt. De esta, se pipetearon en 3 crisoles distintos 5 ml en cada uno. Se llevaron a sequedad en estufa y luego se colocaron en mufla varias veces. Primeramente se dejaron 4hs., y luego 1h. cada vez. Al sacarlos se los dejó enfriar en desecador y se pesaron hasta llegar a peso constante.

La cantidad de Fe como Fe_2O_3 que quedó retenida en el crisol se calculó por diferencia entre peso del mismo con la solución de

Fe y vacío. En ambos casos se los llevó a peso constante. Se realizó la conversión de μg de Fe_2O_3 a μg de Fe y así se obtuvo la solución patrón valorada por gravimetría de $6.88 \mu\text{g}$ de Fe/ml. Esta fué la que se utilizó para realizar la curva de calibración de Fe total (Fig. 55). Para realizar ésta se pipetearon distintas alícuotas de la solución patrón, se aplicó el método colorimétrico descrito en Métodos, se leyeron las respectivas absorbancias, obteniéndose un valor de $\frac{1}{\text{tg}} = 6.88 \mu\text{g}$.

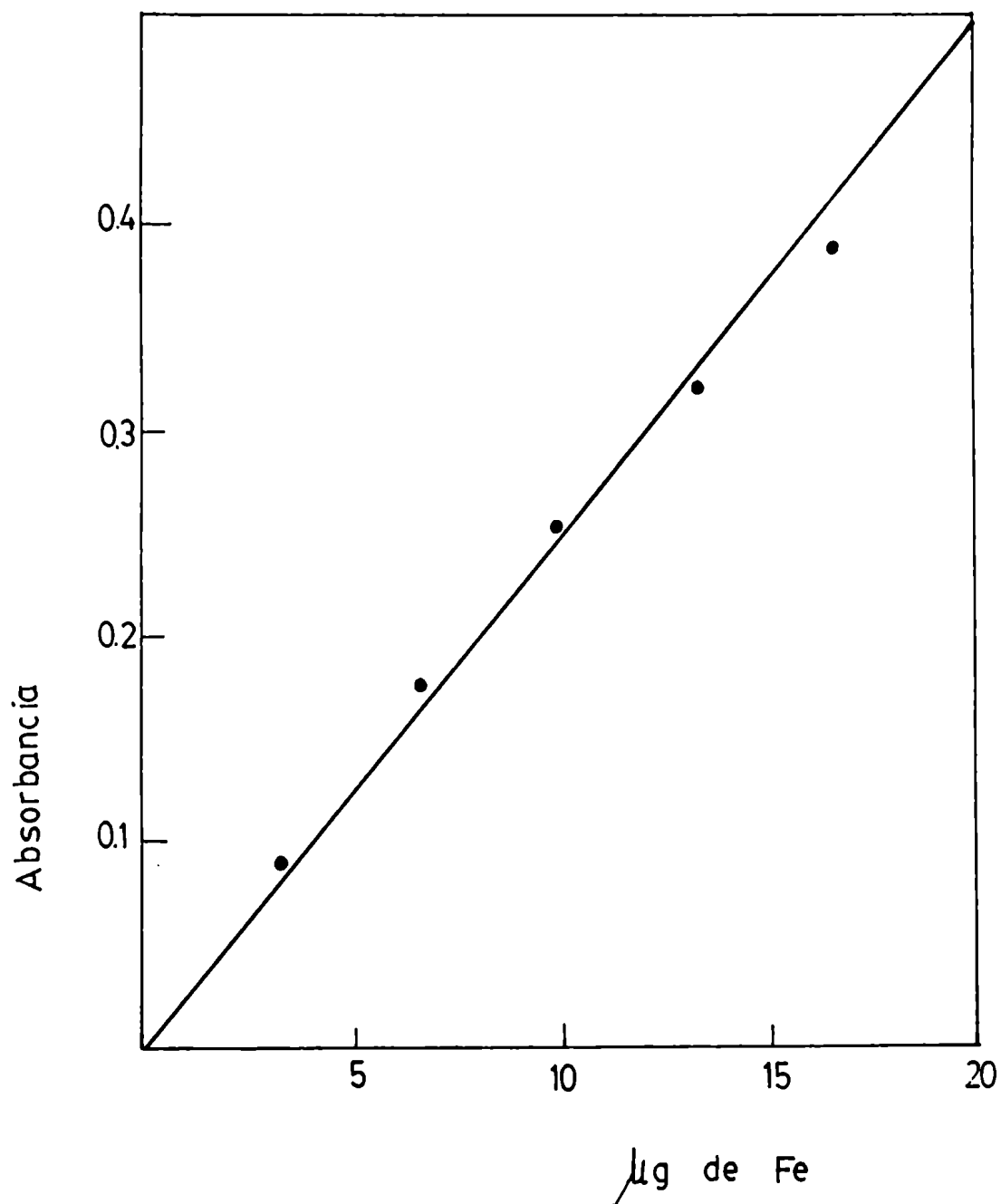
1.a₂.- Fe no hémico.

La solución patrón utilizada fué de $17.66 \mu\text{g}$ de Fe/ml. La valoración fué por gravimetría al igual que en Fe total. Se pipetearon distintas alícuotas y se siguió el procedimiento detallado en Métodos determinándose después de realizar la colorimetría, la cantidad de Fe en cada uno de los tubos agregando 5 ml de reactivo que contiene α 'dipiridilo e hidroxilamina, calentando en un baño hirviendo 5 min. Después que se filtran las proteínas coaguladas se leen las absorbancias. Se obtuvo un valor de $\frac{1}{\text{tg}} = 41.2\mu\text{g}$ (Fig. 56).

1.a₃.- Fe hémico.

Se empleó el método de piridín hemocromógeno. Como solución patrón se empleó hemina 64.8 nmoles de hemina/ml. Se pipetearon distintas cantidades de la solución, la cual se hizo reaccionar con piridina e OHNa.

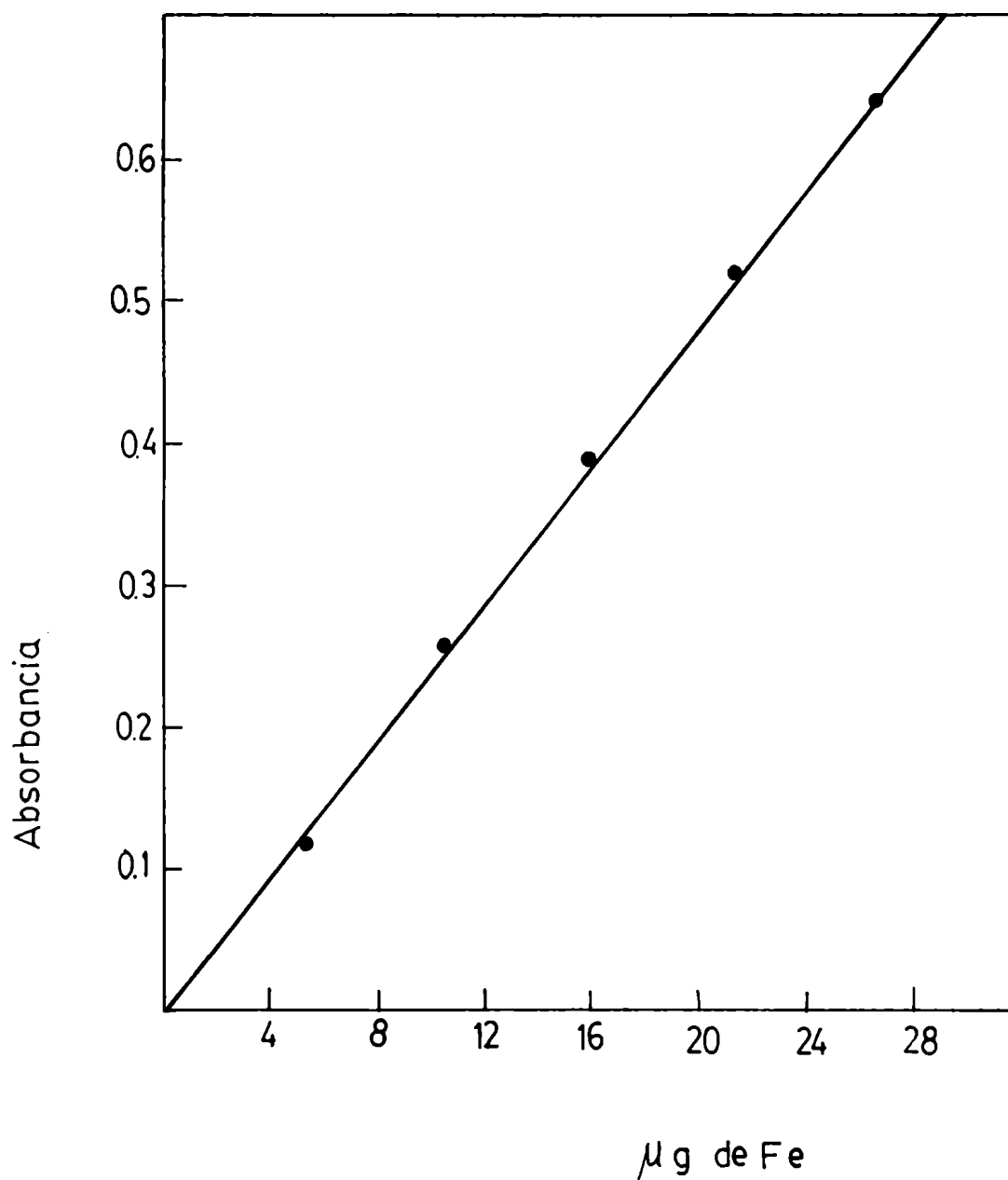
Fig. 55 CURVA DE CALIBRACION DE Fe TOTAL.



Solución patrón utilizada 6.88 μg de Fe/ml. Se valoró por gravimetría. La inversa de la pendiente dió 41.2 μg.

Fig. 56

CURVA DE CALIBRACION DE Fe NO HEMICO.



Solución patrón utilizada 17.66 $\mu\text{g Fe/ml}$. Se valoró por gravimetría. La inversa de la pendiente dió 41.2 μg .

Para determinar el espectro diferencial se dividió la mezcla de reacción en 2 cubetas añadiendo a una $S_2O_4Na_2$ y a otra $Fe(CN)_6K_3$. Para determinar el máximo y el mínimo del espectro diferencial se realizaron 2 ensayos con 1 ml de hemina y se barrió todo el espectro entre 510 y 570 nm (Fig. 57) obteniéndose un mínimo a 538 nm y un máximo a 556 nm. Para determinar el ΔE se leyeron las absorbancias a $\lambda_1 = 538$ y $\lambda_2 = 556$. Se graficó dicho ΔE (obtenido restando la absorbancia a 538 de la obtenida a 556), en función de los nmoles de hemina. Estos nmoles de hemina, son iguales a los nmoles de Fe, para las distintas cantidades de hemina pipeteadas. Se obtuvo un valor de $1/tg = 375$ nmoles (Fig. 58).

1.b.- Efecto del HCB sobre el contenido de Fe hepático.

Se quiso determinar la relación que existe entre el contenido de Fe hepático y la porfiria por HCB. Para ello se trabajó con ratas Wistar hembras, de aproximadamente 180 g de peso, normales e intoxicadas con HCB hasta adquirir severa porfiria. En todos los experimentos se determinó al mismo tiempo el contenido de Fe total, hémico y no hémico hepático en ratas normales y en tratadas con la droga.

Los animales fueron sacrificados, se extrajeron los hígados, se lavaron con solución fisiológica, se secaron con papel de filtro y se pesaron para poder realizar un homogenato en ClK 0.134 M en la relación 1 g de hígado a 5 ml con la mezcla de homogeneización. Esta misma forma de homogeneización se utiliza para determinar las enzi-

Fig.57 ESPECTRO DIFERENCIAL DEL PIRIDIN HEMOCROMOGENO DE HEMINA

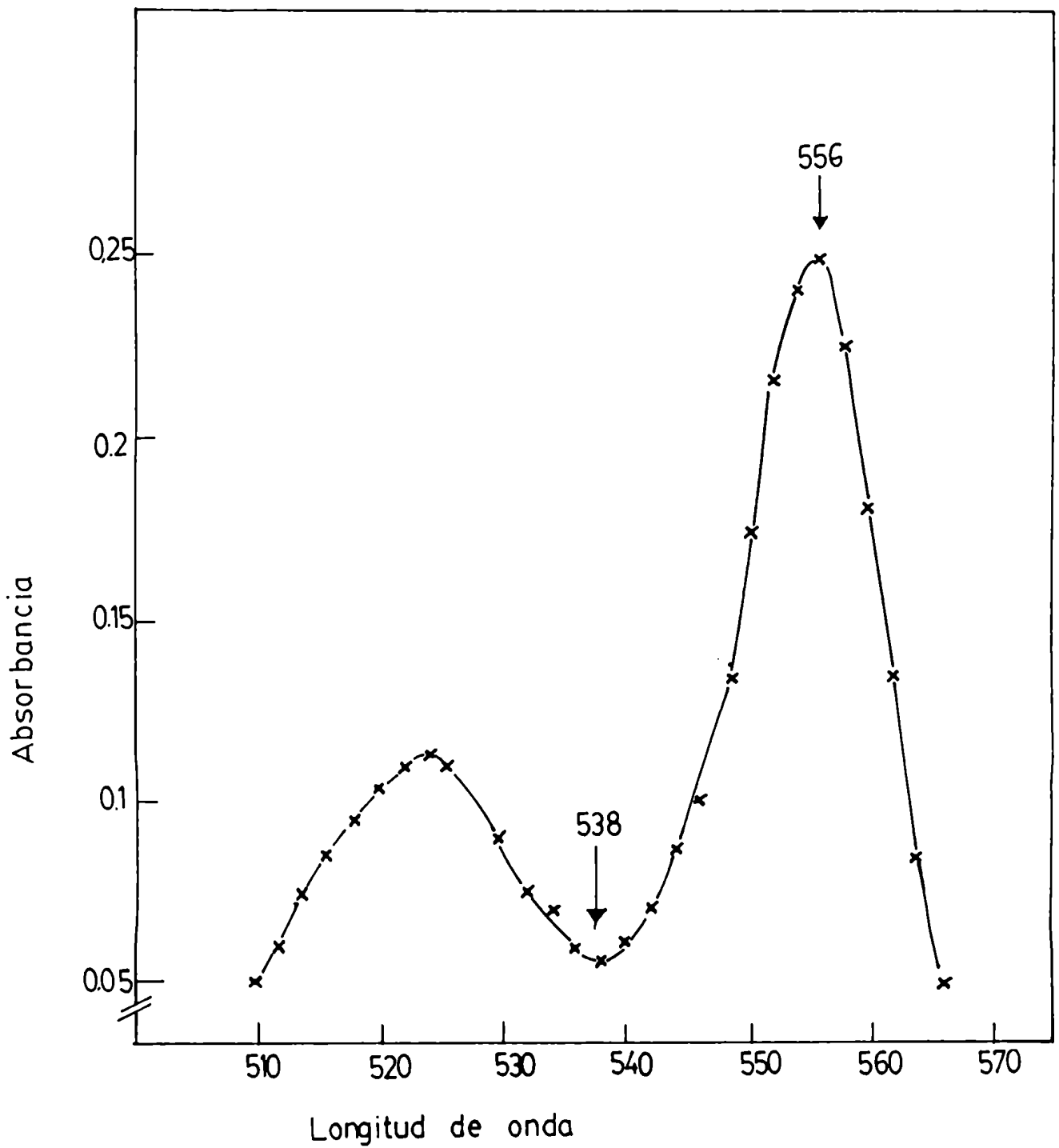
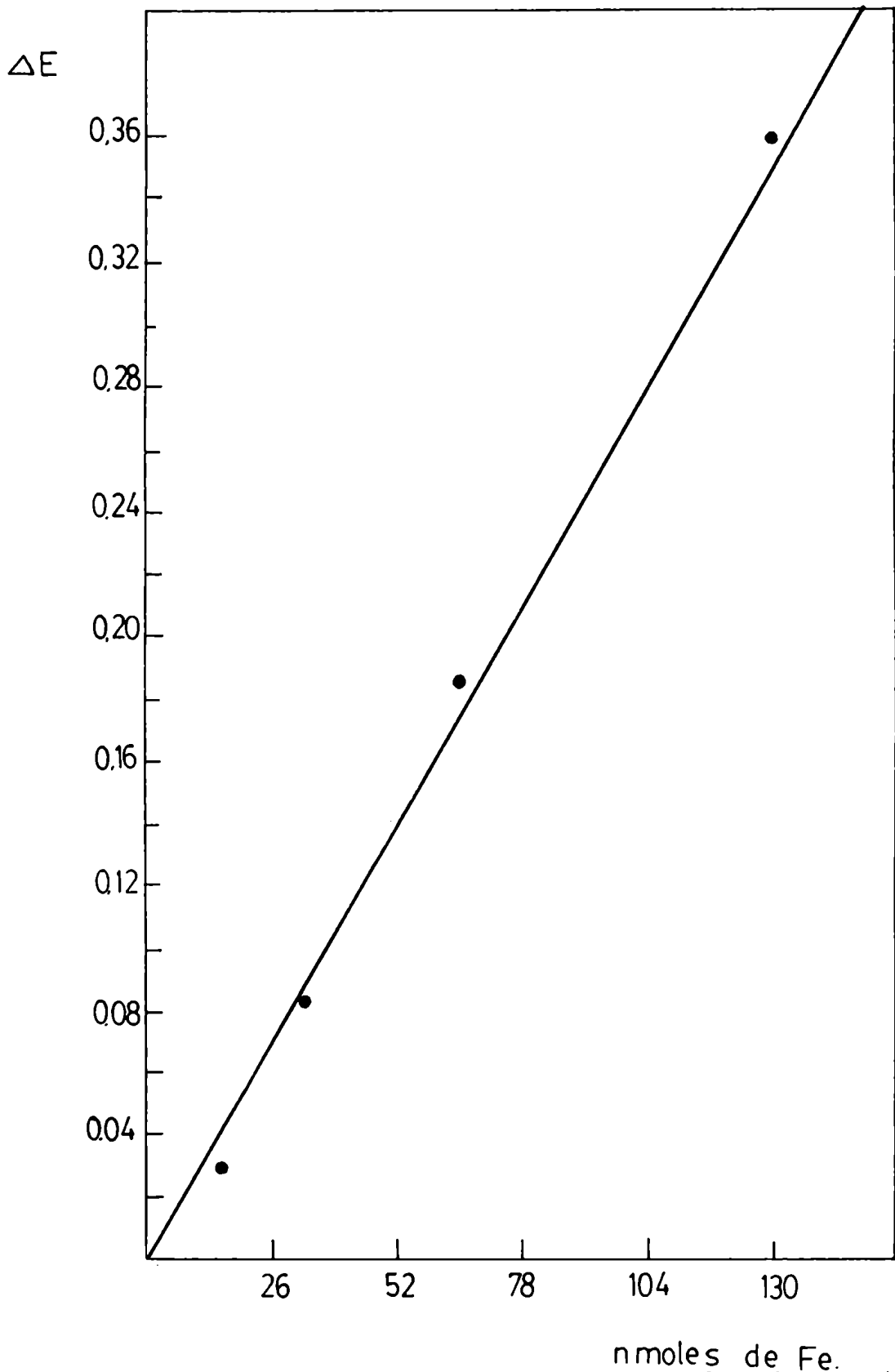


Fig.58 CURVA DE CALIBRACION PARA Fe HEMICO



Solución patrón utilizada 64.8 nmols de hemina/ml. La inversa de la pendiente dió 375 nmols. ΔE : diferencia entre las absorbancias a 556 y 538 nm.

mas ALA-D, PBG-asa, Uro-D, ferroquelatasa, citocromo P-450 y contenido en porfirinas.

Los distintos tipos de Fe fueron determinados como se indica en Métodos utilizando las respectivas curvas de calibración de las Figs. 55, 56 y 58.

En la Tabla XVIII se observa que el contenido en Fe total aumenta 127 μ g de Fe/g de hígado, el hémico disminuye 2 μ g de Fe/g de hígado y el no hémico aumenta 16 μ g/g de hígado. Por lo tanto, el aumento del Fe no hémico compensaría y superaría la disminución del Fe hémico.

El aumento del Fe total del hígado porfírico respecto al hígado normal (Tabla XVIII) es del 84%. Estas determinaciones fueron repetidas en varios experimentos. En estos se emplearon ratas intoxicadas con severa y con leve porfiria. Se observó una gran fluctuación en las determinaciones en los distintos animales, tanto normales como porfíricos. Es de hacer notar que el Fe total se determinó por una metodología muy distinta a los otros 2 tipos de Fe. Para el Fe total se empleó el método de calcinación, donde se elimina todo el material orgánico de la muestra. Con este método el Fe no puede quedar en ningún momento atrapado por las proteínas al realizar la desproteínización o la filtración, como puede ocurrir en la determinación de Fe no hémico, ya que estos procedimientos no se incluyen en el método de determinación de Fe total por calcinación.

Se realizó también la determinación del Fe total por el mismo

TABLA XVIII. EFECTO DEL HCB SOBRE EL CONTENIDO DE FE HEPATICO EN SUS DISTINTAS FORMAS.

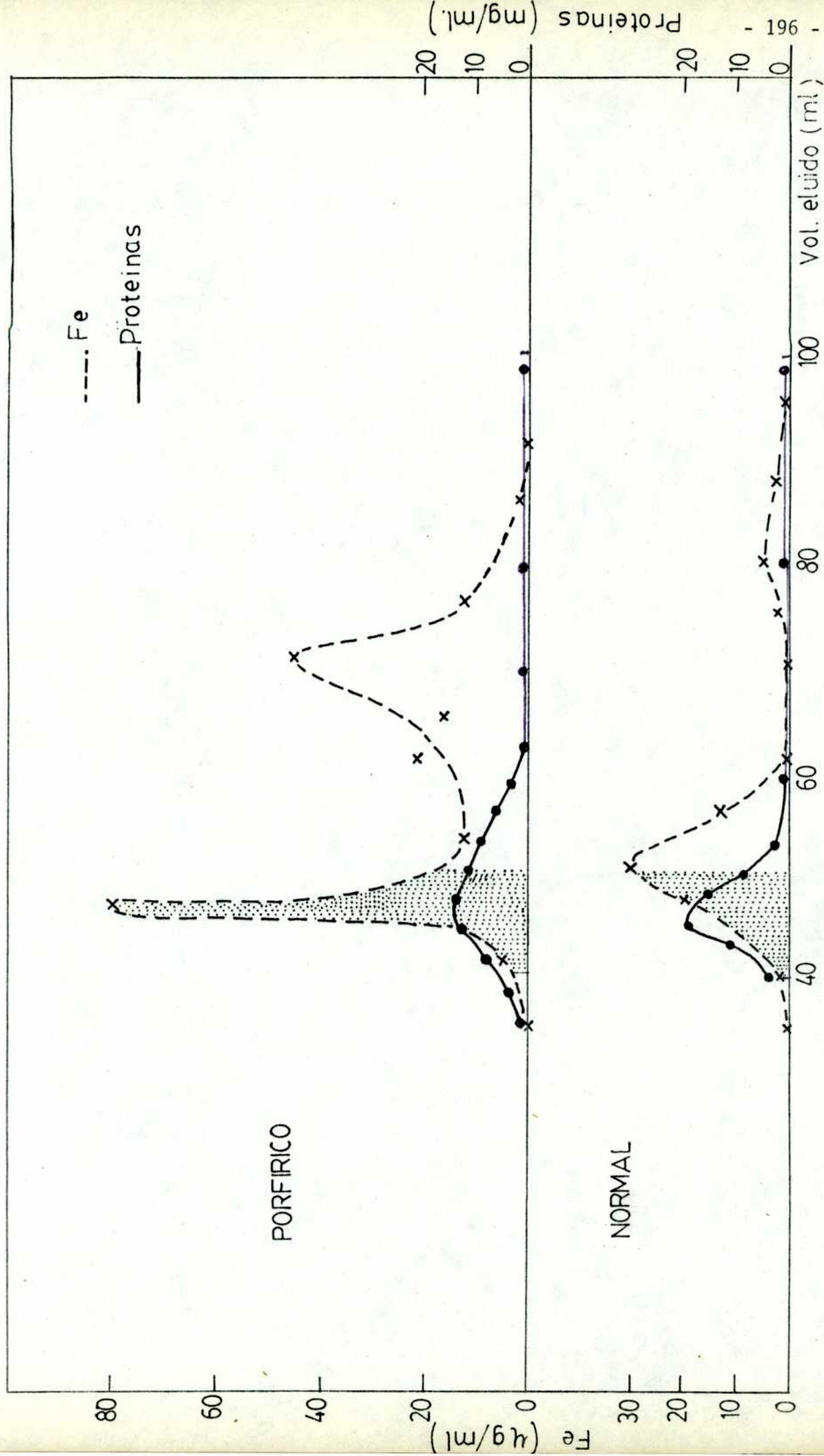
HIGADO		µg DE FE / g DE HIGADO.	
	FE TOTAL	FE HEMICO	FE NO HEMICO
NORMAL	151.9	7.5	87.5
PORFIRICO	279.1	5.7	103.7

Los resultados son promedios de los contenidos de Fe de homogenatos de hígado de 6 animales. La calcinación para determinación de Fe total se realizó sobre alícuotas de 0.5 ml de homogenatos de hígados normales y porfíricos y la colorimetría sobre alícuotas de 2 ml de la solución clorhídrica de Fe. El Fe hémico se determinó sobre alícuotas de 1 ml de homogenato. El Fe no hémico sobre alícuotas de 0.5 ml de homogenato. La parte experimental se detalla en Métodos.

método que el Fe no hémico como se indica en Métodos. Los valores de contenidos obtenidos en estas determinaciones son mucho más bajos que los obtenidos por calcinación tanto para homogenatos, sobrenadantes de 11.000 g como para sobrenadantes de 11.000 g pasados a través de columnas de G-25.

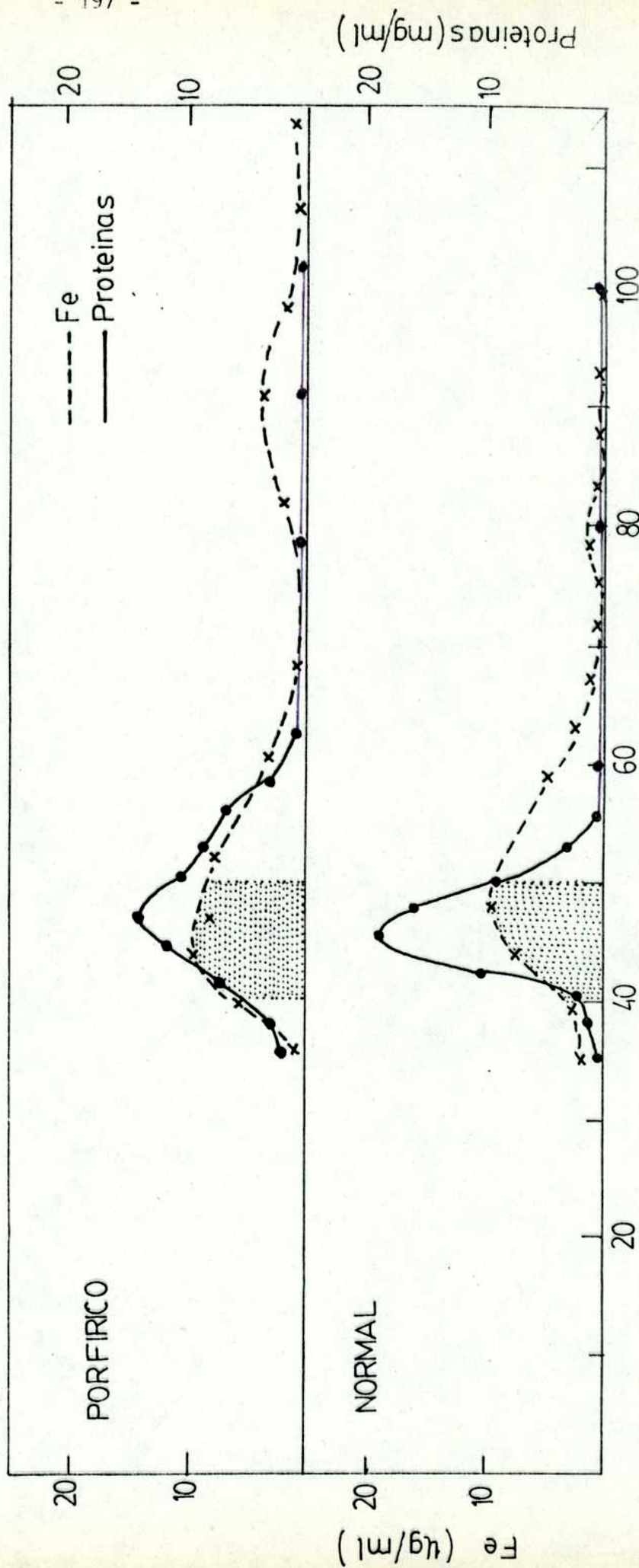
Para determinar la actividad de la enzima Uro-D y PBG-asa hay que pasar los sobrenadantes de 11.000 g de hígados porfíricos a través de columna de G-25 para eliminar las porfirinas endógenas que interfieren en las determinaciones de actividad. Se quiso saber cuánto Fe se incorporaba en estas determinaciones y si el mismo era libre o unido a proteínas. Para ello se pasó un sobrenadante de hígado normal y uno de hígado porfírico a través de una columna de G-25 (Figs. 59, 60 y 61). En cada tubo eluído se determinó Fe total, Fe no hémico, Fe hémico y proteínas. En la Fig. 59 se observa el perfil de elución del Fe total y de proteínas. Estas determinaciones fueron repetidas varias veces. Los perfiles dieron siempre semejantes; observándose en todos los casos que el pico más elevado de Fe coincide con el de proteínas tanto en el normal como en el porfírico. Después de eluir aproximadamente 20 ml más aparece otro pico de Fe pero menor que el primero. La parte más importante de Fe se halla unido a proteína y el resto es Fe libre. Los sobrenadantes normal y porfírico se pasaron a través de distintas columnas de G-25. El Fe no hémico dió una curva de elución semejante a la del Fe total (Fig. 60) pero las áreas de los picos fueron menores. El Fe hémico dió una curva mucho más baja pero de la misma forma y coincidente

Fig. 59. Fe TOTAL ELUIDO DE COLUMNAS DE SEPHADEX G-25 DE SOBRENADANTES NORMALES Y PORFIRICOS.



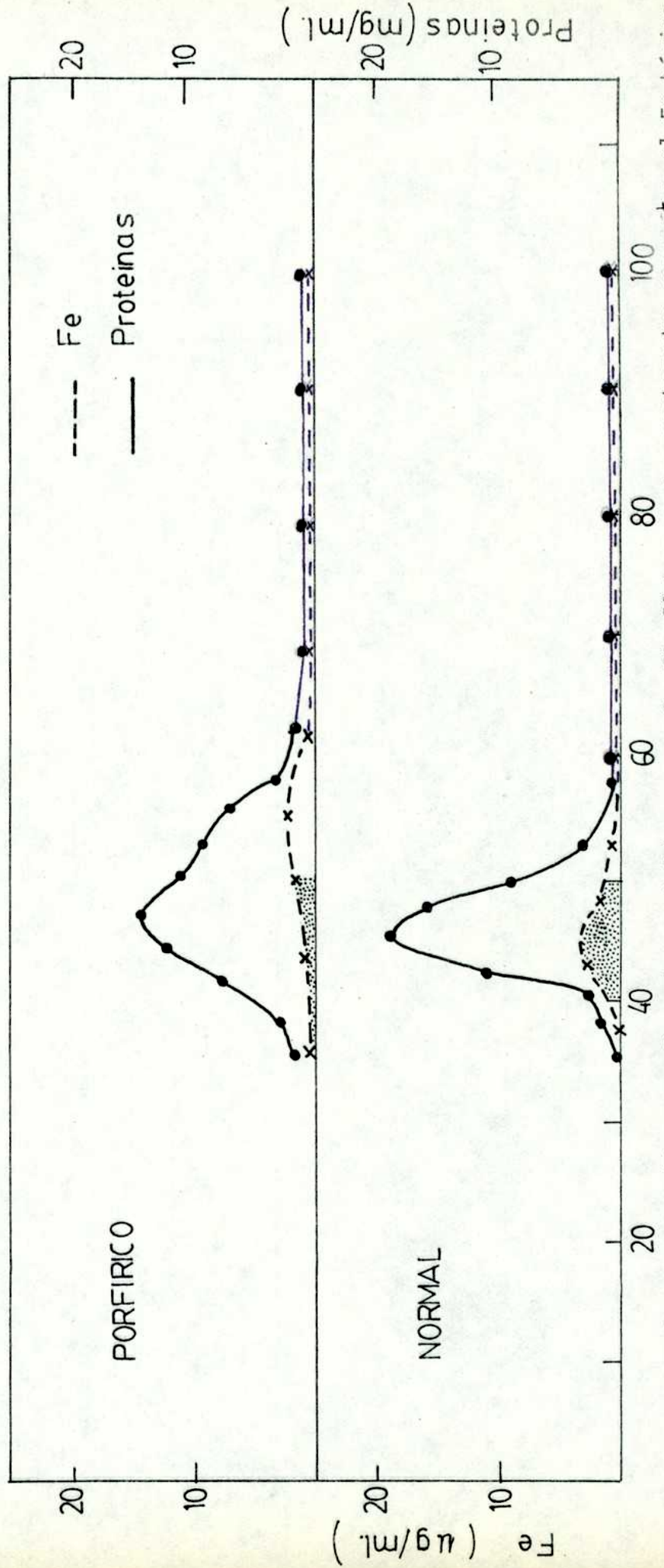
Se sembró 4ml de sobrenadante de 11000g de homogenato de hígado normal y porfírico. Desde el momento de la siembra se comenzaron a recoger fracciones de 1ml de eluido en tubos graduados. La parte sombreada muestra el Fe y las proteínas determinadas en las determinaciones enzimáticas de Uro-D. La determinación de proteínas y Fe se realizan como se indica en Métodos.

Fig.60 Fe NO HEMICO ELUIDO DE COLUMNAS DE SEPHADEX G-25 DE SOBRENADANTES NORMALES Y PORFIRICOS.



Las determinaciones se realizan con los mismos eluidos que en la Fig. 59. Las partes sombreadas muestran el Fe no hémico eluido en las determinaciones enzimáticas de Uro-D. Las cantidades de Fe se miden como se detalla en Métodos.

Fig. 61 Fe HEMICO ELUIDO DE COLUMNAS DE SEPHADEX G-25 DE SOBRENADANTES NORMALES Y PORFIRICOS.



Las determinaciones se realizan con los mismos eluidos que en la Fig. 59. Las partes sombreadas muestra el Fe hémico en las determinaciones enzimáticas. El Fe hémico se mide como se detalla en Métodos.

con el pico de proteínas y por lo tanto con el primer pico de Fe total y no hémico. No se observó aparición de un segundo pico al determinar este tipo de Fe (Fig. 61).

Todas las determinaciones fueron repetidas varias veces y con distintas columnas de G-25 de poro grueso.

Se empleó también para las determinaciones una columna de Sephadex G-25 de poro fino. La elución en este caso fué muy lenta. El primer pico de Fe total se obtuvo desdoblado en 3 subpicos correspondiendo posiblemente a 3 tipos distintos de proteínas unidas a Fe. Esto se produjo tanto en el normal como en el porfírico.

Se calculó la cantidad de Fe incorporado en las preparaciones enzimáticas para determinar Uro-D por mg de proteína Tabla XIX. Se observa que en la preparación porfírica hay una incorporación mayor de Fe total y Fe no hémico y una menor de Fe hémico referido a la cantidad de proteínas. Para obtener estos valores se dividió la cantidad de Fe incorporado por la cantidad de proteína incorporada, área sombreada de la Fig. 59. Existe en estos valores mucha fluctuación. Según las columnas los picos de Fe pueden ser más o menos achatados incorporándose por lo tanto más Fe o menos Fe según la columna. En todas las columnas se mantuvieron las relaciones del porfírico respecto al normal, en el sentido que se incorpora mayor cantidad de Fe total y no hémico y menor cantidad del hémico en el ensayo porfírico.

TABLA XIX. CONTENIDO EN FE DE LA PREPARACION ENZIMATICA USADA
 PARA LA DETERMINACION DE URO-D.

SOBRENADANTE DE HOMOGENATO PASA- DO POR	UG DE	FE / MG	DE PROTEINA.	FE TOTAL	FE HEMICO	FE NO HEMICO
SEPHADEX G-25				1.2	0.05	0.35
NORMAL				1.2	0.05	0.35
PORFIRICO				2.5	0.03	0.43

Los resultados son los promedios de los contenidos de Fe de sobrenadantes de 11000xg de hígado de 6 ratas. La calcinación para la determinación de Fe total se realizó sobre alícuotas de 0.5 ml de sobrenadantes normales y porfíricos y la colorimetría sobre alícuotas de 2 ml de la solución clorhídrica de Fe. El Fe hémico se determinó sobre alícuotas de 1 ml de sobrenadante. El Fe no hémico sobre alícuotas de 0.5 ml de sobrenadante. La parte experimental se detalla en Métodos.

2.- EFEECTO DE QUELANTES (α α' BIPIRIDILO Y 8 HIDROXIQUINOLINA) SOBRE LA ACTIVIDAD DE DISTINTAS ENZIMAS DE HIGADOS DE RATAS NORMALES E INTOXICADAS CON HCB.

Se quiso determinar el papel que juega el Fe en la disminución o aumento de las actividades de las enzimas del camino del hemo. Para ello, uno de los experimentos planificados fué el de retirar Fe del medio de incubación. Esto se realizó a través del agregado de quelantes, "in vitro" en el medio de incubación. Como quelantes se eligieron α α' biperidilo y 8 hidroxiquinolina. El primero quela al Fe⁺⁺ y el segundo al Fe⁺⁺⁺. Se comenzó probando concentraciones de 10^{-2} M y 10^{-3} M pero luego se trabajó con concentraciones de 10^{-3} M.

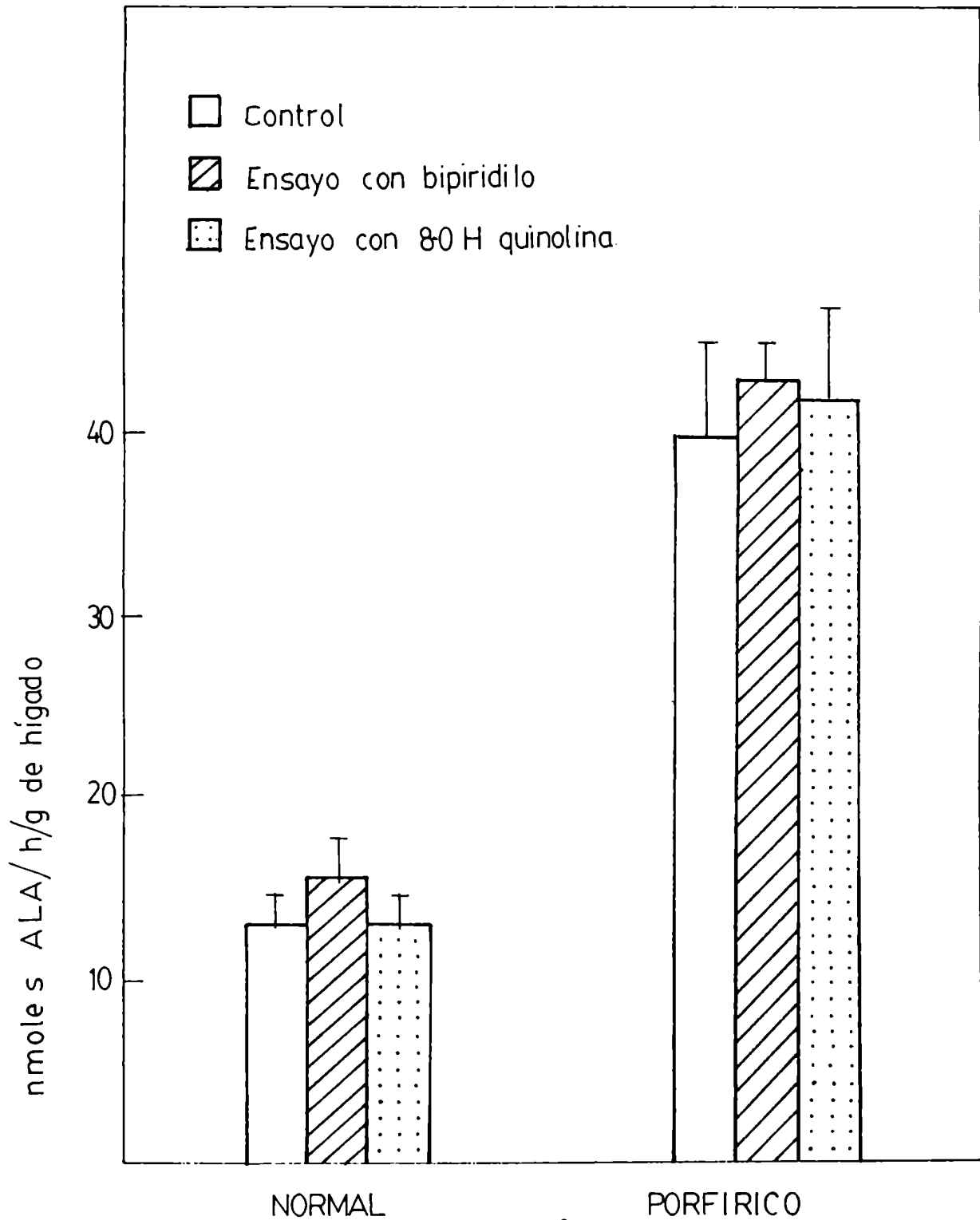
2.a.- Adición de quelantes al medio de incubación de ALA-S.

Se trabajó con homogenatos de hígado de ratas Wistar normales e intoxicadas con HCB como se indica en Métodos. Se realizó un control normal y uno porfírico. Las actividades que se obtuvieron en estos ensayos, se compararon con los ensayos a los cuales se les adicionaron al medio de incubación los quelantes. No se observó diferencia significativa de la actividad de esta enzima ni al agregar α α' biperidilo ni al agregar 8 OH quinolina ya sea a la preparación normal como a la preparación porfírica (Fig. 62). La actividad de la enzima porfírica se elevó un 220% respecto a la normal con o sin la adición de quelantes.

2.b. Adición de quelantes al medio de incubación de ALA-D.

Se utilizó como preparación enzimática sobrenadante de 11.000 g

Fig. 62 ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ALA-S CON LA ADICION DE QUELANTES.



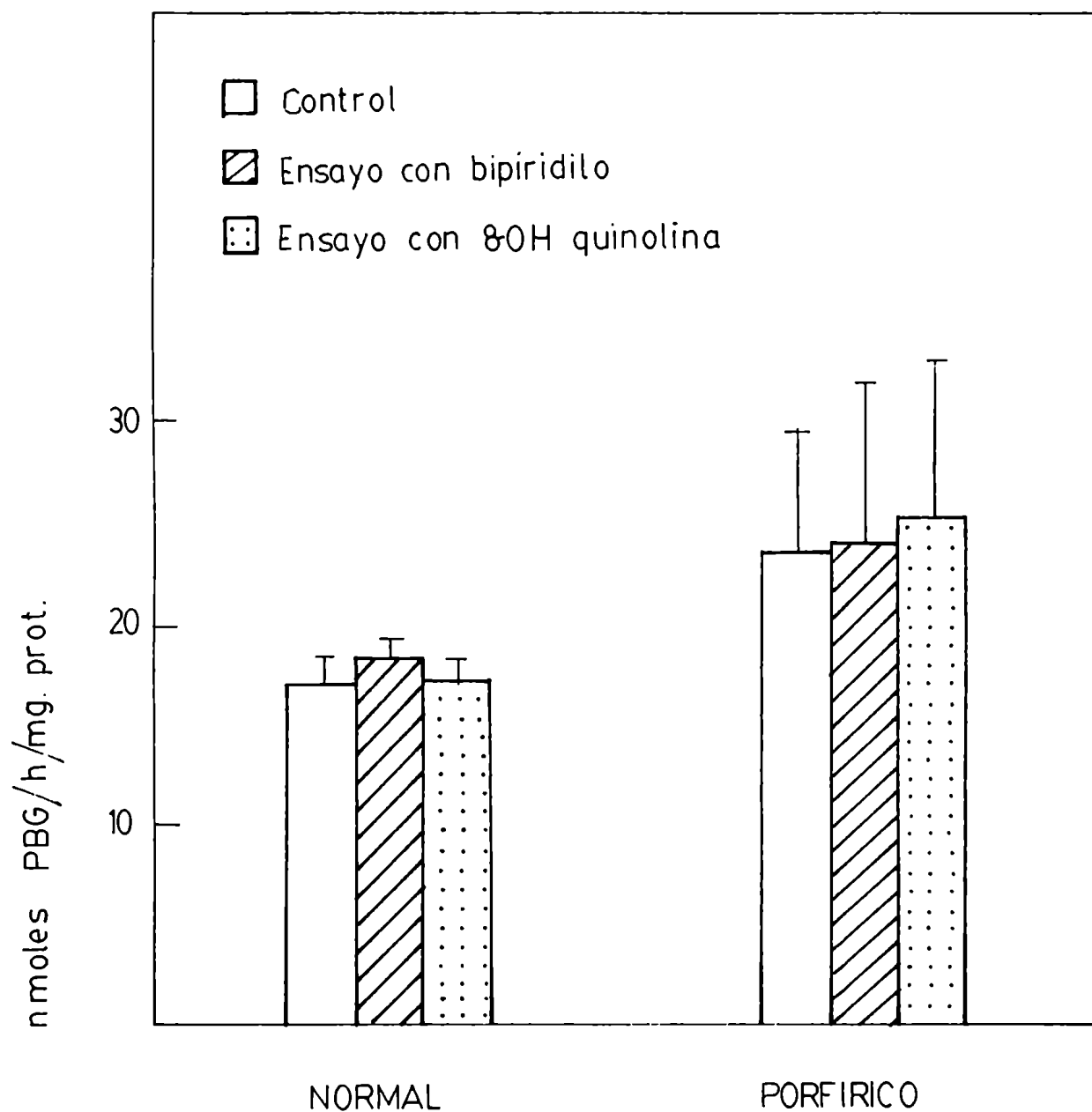
α α' biperidilo $10^{-3}M$ - 8 OH quinolina $10^{-3}M$ en el medio de incubación. Las barras representan el promedio de las determinaciones de 4 ratas \pm E.S.

20 min. de homogenatos de ratas normales e intoxicadas con HCB. La incubación se realizó como se indica en Métodos. Se realizaron los controles normales y porfíricos. A estos se les adicionó en el medio de incubación $\alpha\alpha'$ -bipiridilo y 8 OH quinolina en concentraciones de 10^{-3} M. Al adicionar estos 2 quelantes no se observaron diferencias significativas respecto a los controles ni en los sobrenadantes normales ni en los porfíricos (Fig. 63). Es de hacer notar que se obtiene una activación del 38% del porfírico respecto al normal considerando los valores medios,

2.c.- Adición de quelantes al medio de incubación de PBG-asa.

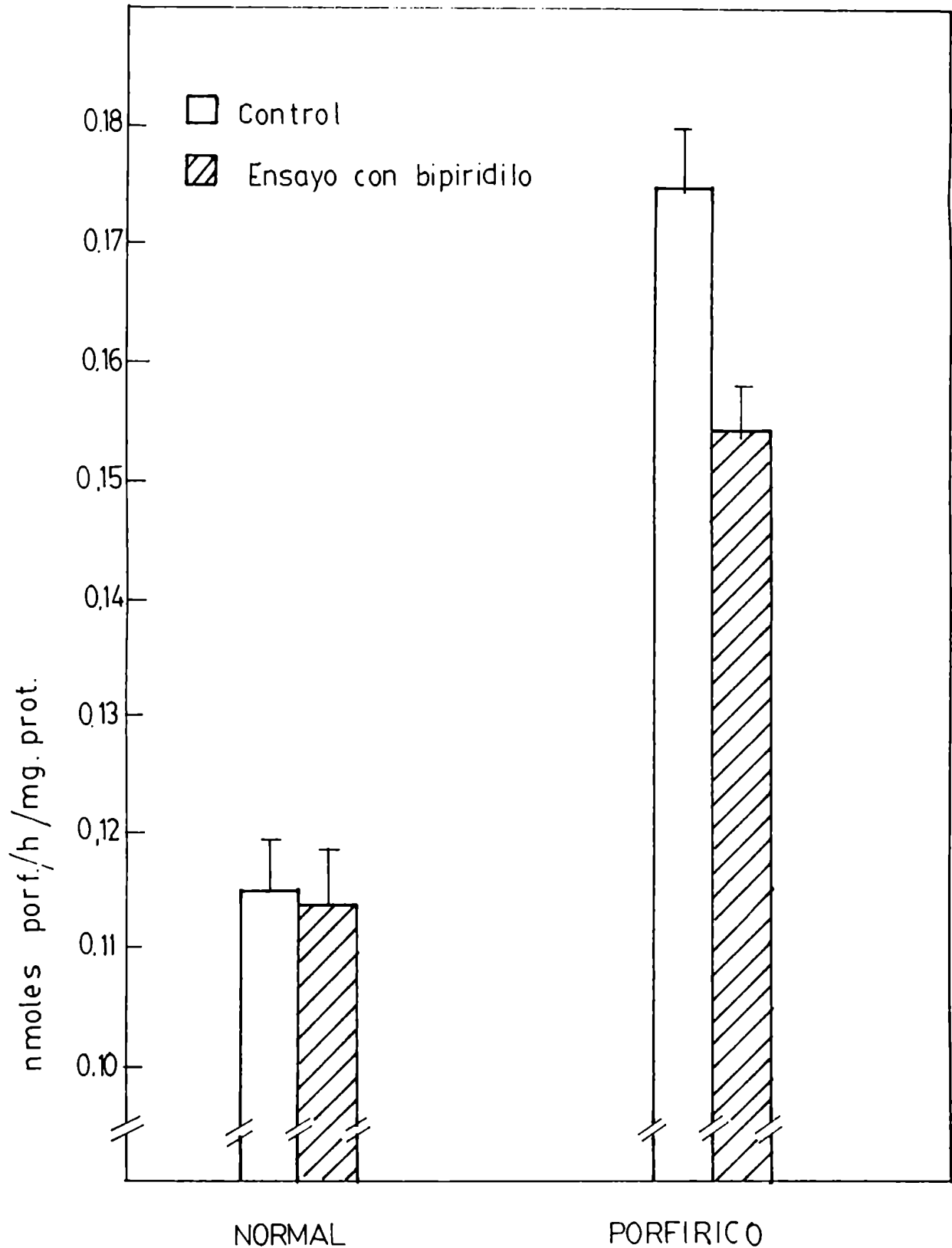
Como preparación enzimática se utilizó sobrenadantes de 11.000g 20 min, pasados por columnas de G-25 de homogenatos de ratas normales y porfíricas. La incubación se realizó como se indica en Métodos. Como quelante se adicionó al medio de incubación solo $\alpha\alpha'$ -bipiridilo en concentraciones de 10^{-3} M. No se pudo adicionar 8 OH quinolina, pues ésta interfería en las lecturas de porfirinas en el espectrofotómetro; siendo esta la metodología para determinar la actividad de la enzima. En la Fig. 64 se observa un aumento de actividad del 52% entre el normal y el porfírico. Cuando se adiciona el quelante al medio de incubación normal no se obtienen diferencias significativas. Cuando dicho quelante se halla en el medio de incubación del porfírico hay una disminución de actividad del 12%. Con estos resultados podríamos atribuirle al Fe^{++} una parte del aumento de actividad de esta enzima porfírica respecto a su control normal.

Fig. 63 ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ALA-D CON LA ADICION DE QUELANTES.



α' biperidilo $10^{-3}M$. 8 OH quinolina $10^{-3}M$ en el medio de incubación. Las barras representan el promedio de las determinaciones de 4 ratas \pm el error standard ($\bar{X} \pm ES$)

Fig. 64 ACTIVIDAD ESPECIFICA DE PBG-ASA CON LA ADICION DE QUELANTES.



$\alpha \alpha'$ biperidilo $10^{-3}M$ en el medio de incubación. Las barras representan el promedio de las determinaciones de 4 ratas \pm el error standard ($\bar{x} \pm ES$).

2.d.- Adición de quelantes al medio de incubación de Uro-D.

Se utilizó el mismo sobrenadante que para la determinación de PBG-asa y se incubó como se indica en Métodos. Se adicionaron en el medio de incubación 2 concentraciones de α α' bipyridilo (10^{-3} M y 10^{-2} M) e hidroquinolina en una concentración de 10^{-3} M. Se midieron ambas etapas de decarboxilación; la desaparición de Uro'gen y la aparición de Copro'gen (Figs. 65 y 66). Tanto en la primera como en la segunda etapa no se observan diferencias significativas en la actividad de normales y porfíricas al agregar los quelantes. La disminución de actividad entre un normal y un porfírico resultó ser en este caso 58% para la primera etapa y 90% para la segunda etapa.

3.- EFFECTO DEL AGREGADO DE FERRITINA, HEMINA Y SALES DE HIERRO SOBRE LA ACTIVIDAD DE DISTINTAS ENZIMAS DE HIGADO DE RATAS NORMALES E INTOXICADAS CON HCB.

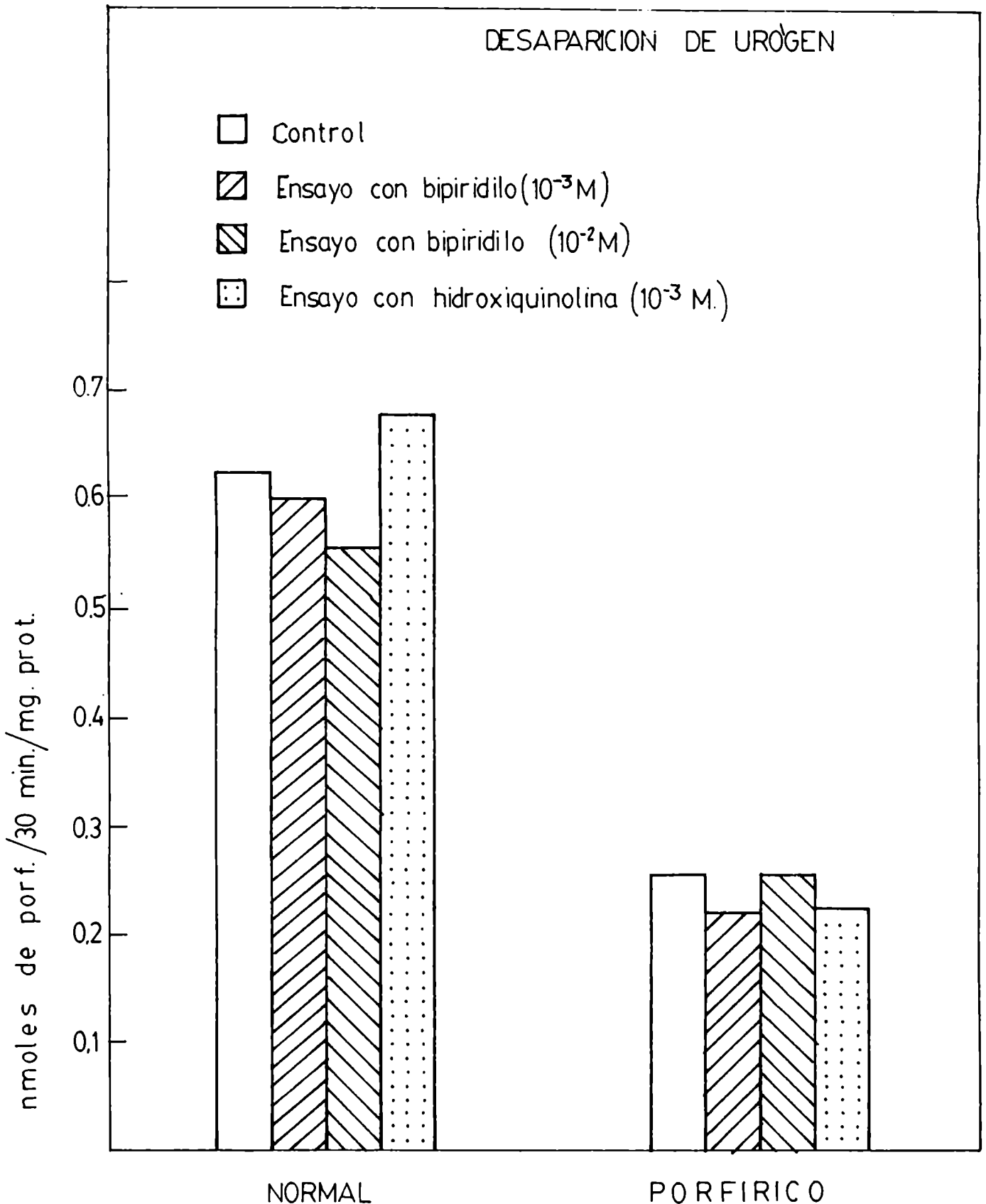
Para investigar el efecto del Fe in vitro sobre las distintas enzimas, se adicionó el mismo al medio de incubación. Este fué incluido en los ensayos en distintas formas y concentraciones. Se probó la adición de Fe inorgánico adicionándolo como $(SO_4)_2 Fe (NH_4)_2 6H_2O$ ó $SO_4 Fe 7H_2O$; Fe hémico como hemina y Fe ligado a proteínas como ferritina.

En todos los casos posibles se trató de probar al hierro en sus 2 formas: oxidado y reducido. Para mantenerlo en estado reducido se añadió CySH ó GSH.

3.a.- Determinación de la cantidad de Fe en la solución de ferritina.

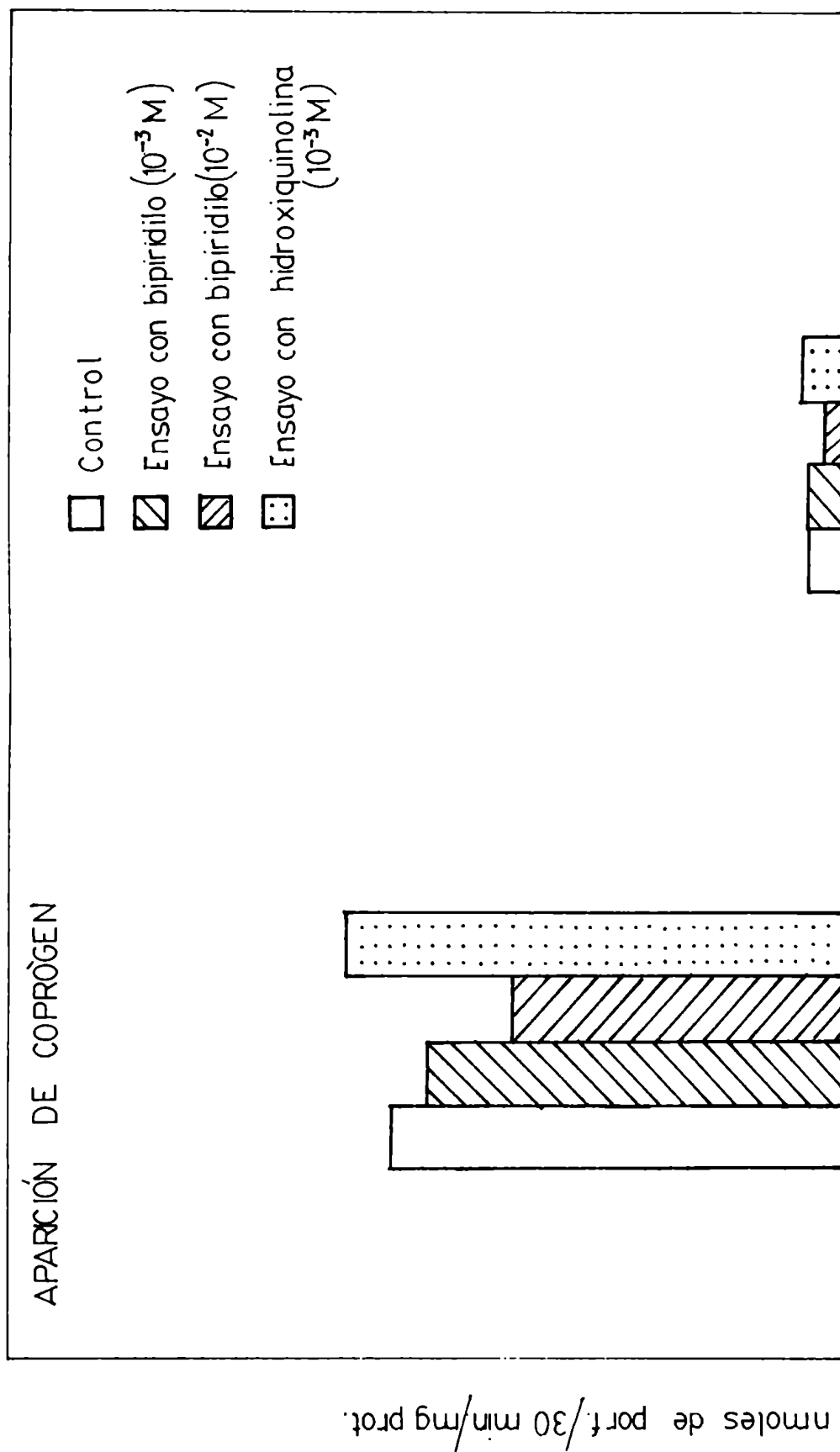
Se determinó la cantidad de Fe que contenía la ferritina de

Fig. 65 ACTIVIDAD ESPECIFICA DE URO-D CON LA ADICION DE QUELANTES.



Preparación enzimática: Sobrenadante de 11000g 20min pasado por Sephadex G-25. Proteínas incubadas (10-12mg). Urogen incubado (6-8nmoles). Las barras representan el promedio de las determinaciones de 2 animales.

Fig. 66 ACTIVIDAD ESPECIFICA DE URO-D CON LA ADICION DE QUELANTES.



NORMAL

PORFIRICO

Preparación enzimática: Sobrenadante de 11000g 20 min pasado por Sephadex G-25. Proteínas incubadas (10-12mg). Uro'gen incubado (6-8 nmoles). Las barras representan el promedio de las determinaciones de 2 animales.

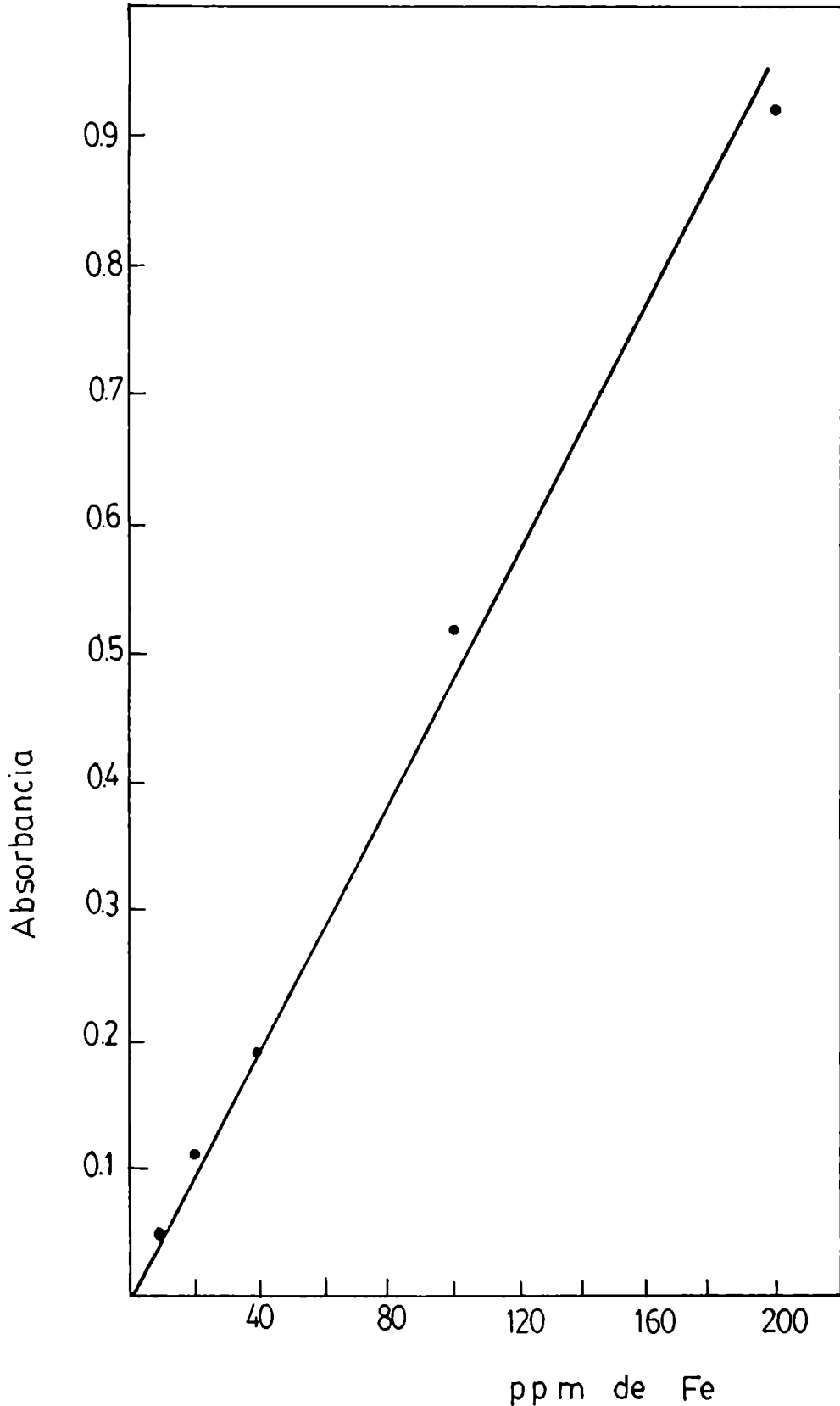
bazo de caballo por medio de espectrofotometría de absorción atómica utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Varian Techtron modelo AA-5.

Se realizó primeramente, con dicho aparato una curva de calibración con $(\text{SO}_4)_2 \text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ Merck.

Las soluciones patrón contenían 200, 100, 40, 20 y 10 ppm de Fe. Se graficaron las lecturas promedios de 2 determinaciones distintas en función de las ppm de Fe (Fig. 67).

Para determinar la cantidad de Fe de la ferritina hubo que realizar previamente una destrucción de materia orgánica. Para ello se pipeteó en distintos Kjeldhall 0.3 ml de muestra de ferritina y 0.3 ml de agua bidestilada. Este último recibió el mismo tratamiento que la muestra y sirvió como blanco. Se adicionó al Kjeldhall una flauta para extraer vapores y se trabajó constantemente bajo campana. Se agregó 4 ml de SO_4H_2 y se calentó con mechero hasta observar que la muestra se pusiera marrón oscuro. Se calentó 30 min más y se agregó 2 ml de NO_3H , lo cual hizo que la muestra tomase color amarillo. Se volvió a calentar hasta humos densos y pesados de trióxido de azufre. La solución quedó límpida y amarilla. Se agregó 3 ml de agua bidestilada y se calentó hasta humos blancos de trióxido de azufre. Se agregó nuevamente agua destilada y se calentó, hasta observar desprendimientos de vapor de agua. Luego se transfirió a un matraz de 50 ml, el cual se enrasó con agua. Se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro de absorción atómica y mediante la curva de calibración se determinó que contenía 128 ppm de Fe.

Fig.67 CURVA DE CALIBRACION PARA DETERMINACION DE Fe POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA.



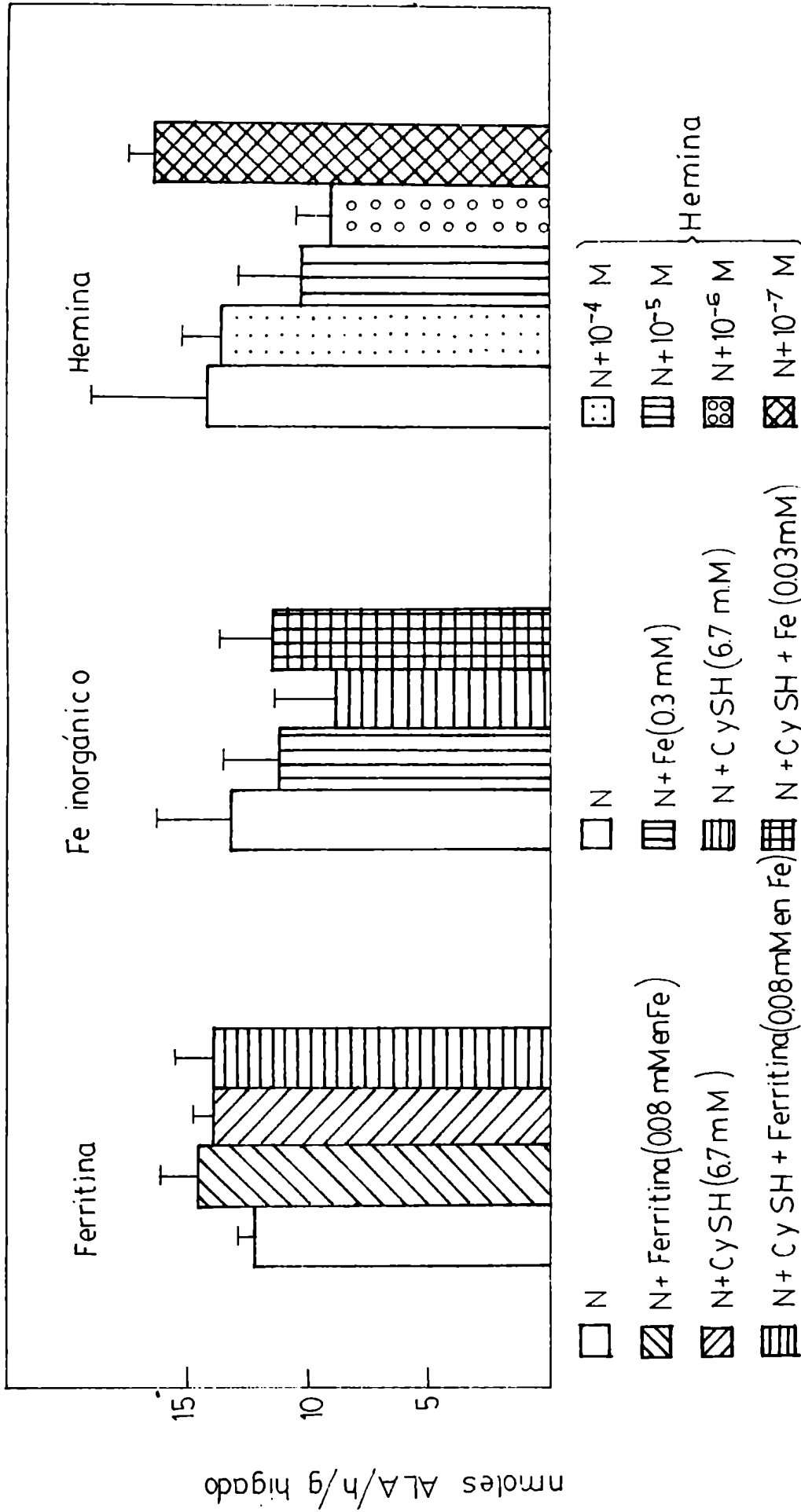
Se utiliza $(SO_4)_2 Fe(NH_4)_6 H_2O$ como droga para la solución patrón cuyas concentraciones se detallan.

3.b.- Efecto de ferritina, Fe inorgánico y hemina sobre la actividad de ALA-S normal.

La actividad de ALA-S normal no se modifica ni por el agregado de CySH 6.7 mM, ni por el agregado de ferritina 0.08 mM en Fe ni por el agregado de ambas sustancias al mismo tiempo (Fig. 68). Se probaron concentraciones de ferritina entre 0.02 y 0.12 mM. Estas concentraciones fueron elegidas en base al trabajo de Kushner y col.(150), quienes estudiaron el efecto del Fe sobre la PBG-asa de hígado de cerdo. Para el rango de concentraciones aquí ensayadas se obtuvieron resultados semejantes a los de la Fig. 68. La cantidad de CySH ensayada fué 6.7 mM ya que con esta concentración Kushner y col.(150) obtenían máxima formación de porfirinas a partir de ALA en extracto crudo de hígado porcino.

Tampoco se observan diferencias significativas en la actividad de la enzima por el agregado de Fe inorgánico en concentraciones 0.3 mM en Fe y en concentraciones 6.7 mM en cisteína. El Fe inorgánico se probó en concentraciones entre 0.03 y 0.3 mM en el medio de incubación. Esta cantidad de Fe adicionado correspondería al rango de contenido total de Fe de hígados de ratas normales e intoxicadas con HCB (Estos cálculos se realizaron de acuerdo a los resultados de la Tabla XVIII de éste capítulo). La hemina fué adicionada en concentraciones de 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-7} M; no habiendo diferencias significativas en la actividad en esta rango de concentraciones (Fig. 68). La actividad de la enzima se midió como se indica en Métodos.

Fig. 68 EFECTO DE FERRITINA, Fe INORGANICO Y HEMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALA-S NORMAL.



Se probaron concentraciones de ferritina entre 0.02 y 0.12mM en Fe. En este gráfico se dan los valores correspondientes a 0.08mM que son representativos del resto. Fe inorgánico se probó en concentraciones entre 0.003 y 0.3mM, araficado en la Fig.71. Las condiciones de incubación para las determinaciones enzimáticas se detallan en Métodos.

3.c. Efecto de ferritina, Fe inorgánico y hemina sobre la actividad de ALA-D normal.

Debido a que esta es una enzima sulfhidrífica se necesita de la presencia de CySH en el medio de incubación para poder determinar su actividad. Por lo tanto no se pudo probar el Fe en su estado oxidado sino solo en su estado reducido. No se observan cambios significativos en la actividad de esta enzima ni con la incorporación de ferritina ni con la incorporación de Fe inorgánico (Fig. 69). Con el agregado de hemina en concentraciones de 10^{-4} M hay un decremento de actividad de un 50% pero con cantidades de 10^{-5} M y menores la actividad recupera sus valores normales. Las condiciones de incubación son las que se indican en Métodos.

3.d.-Efecto de ferritina, Fe inorgánico y hemina sobre la actividad de PBG-asa normal.

El agregado de ferritina y hemina no provoca cambios significativos de la actividad de esta enzima (Fig. 70). El agregado de Fe inorgánico en concentraciones 0.3 mM produce un decremento de actividad de un 14% mientras que el agregado de Fe inorgánico conjuntamente con CySH produce un decremento del 36% o sea que el Fe actuaría más intensamente en su estado ferroso que en su estado férrico (Fig. 70).

3.e.-Efecto del agregado de Fe inorgánico en distintas concentraciones sobre la actividad de ALA-S, ALA-D y PBG-asa.

El agregado de Fe inorgánico en concentraciones de 0.003, 0.03,

Fig. 69 EFECTO DE FERRITINA Fe INORGANICO Y HEMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALA-D NORMAL.

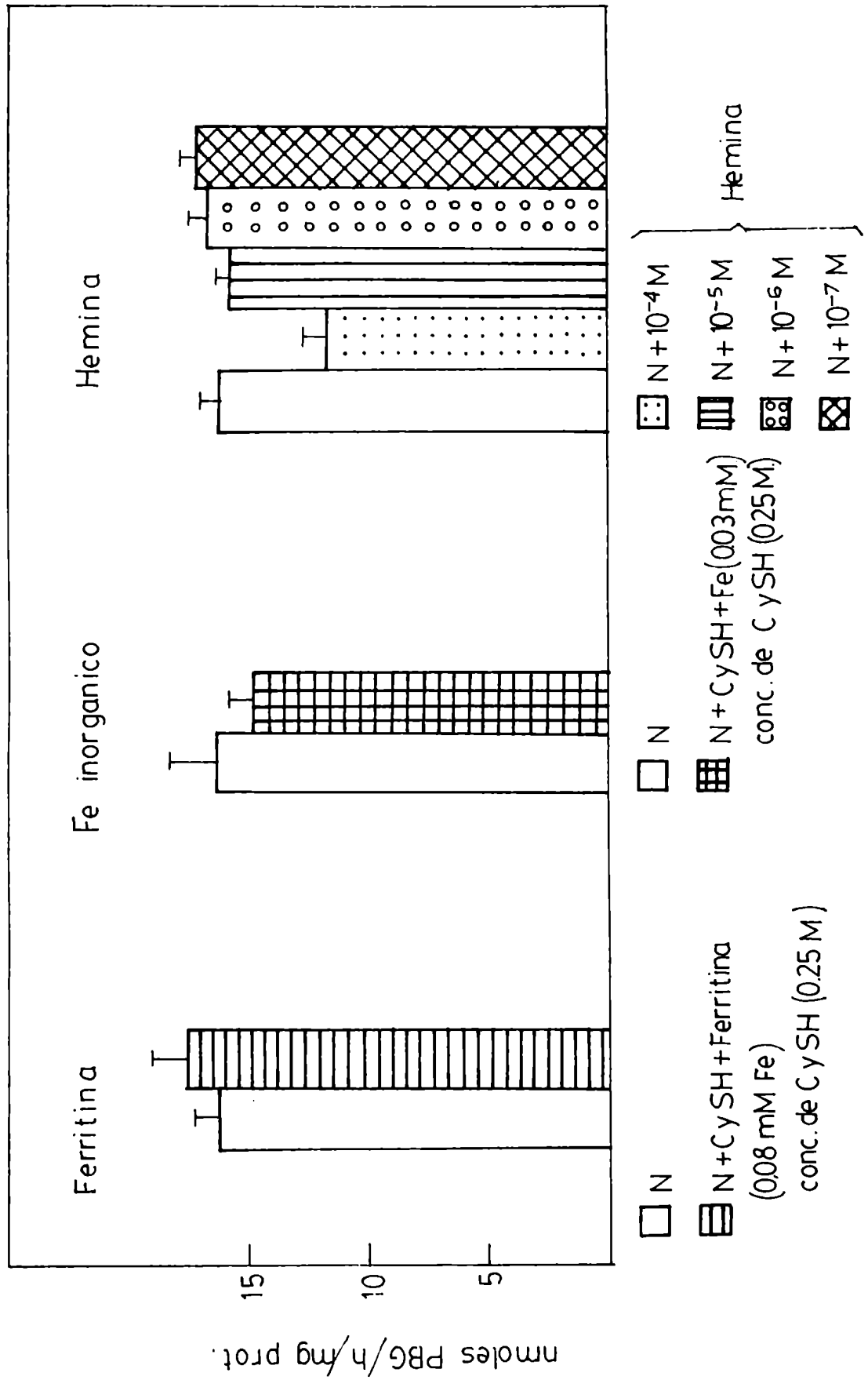
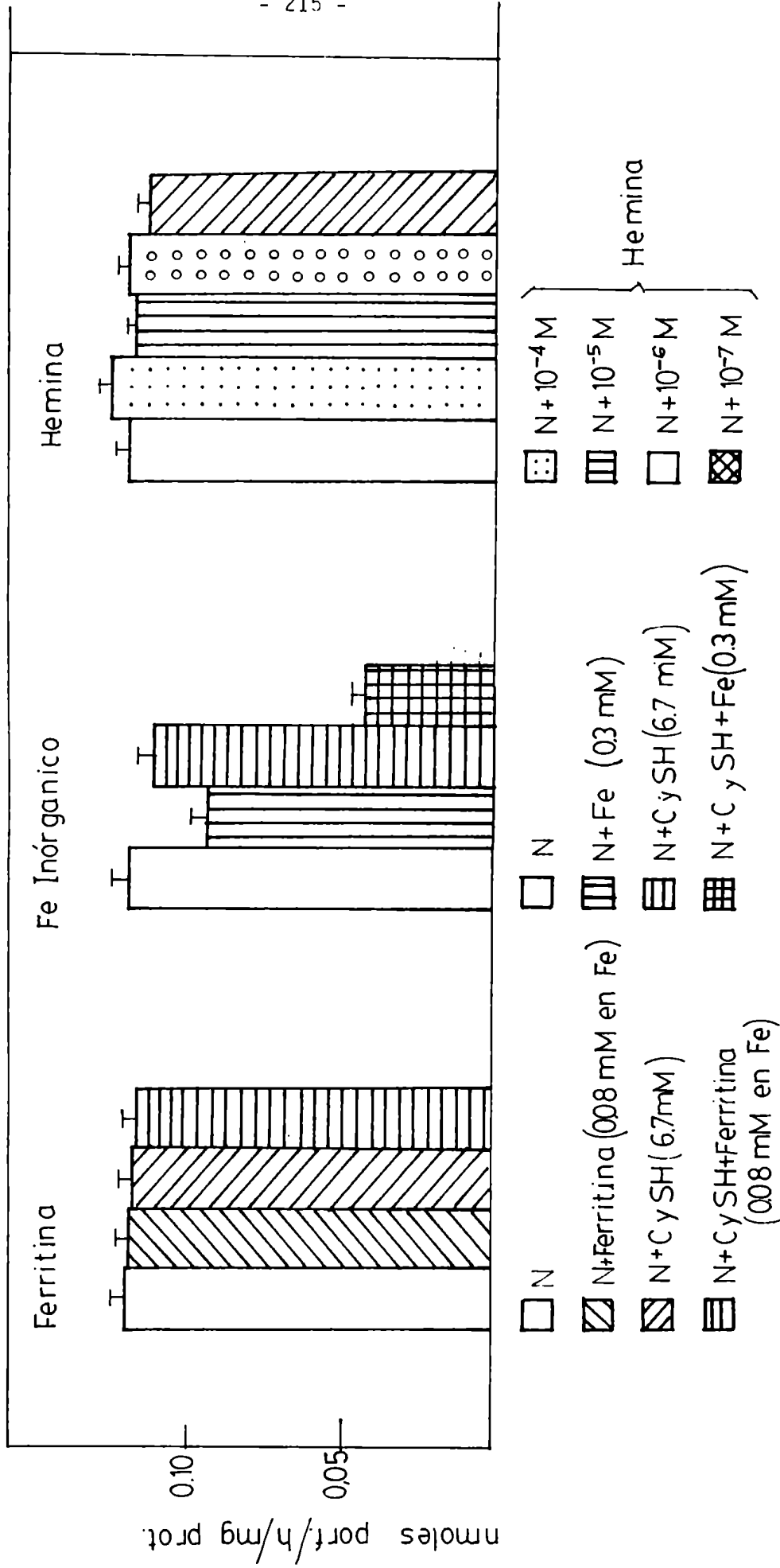


Fig.70 EFECTO DE FERRITINA Fe INORGÁNICO Y HEMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE PBG-ASA NORMAL.



Se probaron concentraciones de ferritina entre 0.02 y 0.12mM en Fe. En este gráfico se dan los valores correspondientes a 0.08mM que son representativos del resto. Fe inorgánico se probó en concentraciones entre 0.03 y 0.3mM graficado en la Fig. 72. Las condiciones de incubación para las determinaciones enzimáticas se detalla en Métodos.

0.15 y 0.3 mM (Fig. 71 y 72) no provoca variación de actividad de la enzima ALA-S con o sin CySH. Hay una pequeña disminución de la actividad de ALA-D entre 0.3 y 0.03 mM.

En cuanto a PBG-asa se encuentra una inhibición del 30% con concentraciones de Fe de 0.3 mM y la adición de CySH. Esta inhibición disminuye a medida que la concentración de Fe es menor hasta llegar a valores normales a concentraciones de 0.003mM.

Sin el agregado de CySH la inhibición es menor entre 0.3 y 0.03 mM. Con concentraciones menores que esta ya no se produce inhibición.

3.f.- Efecto de ferritina, Fe inorgánico y hemina sobre la actividad de de Uro-D normal.

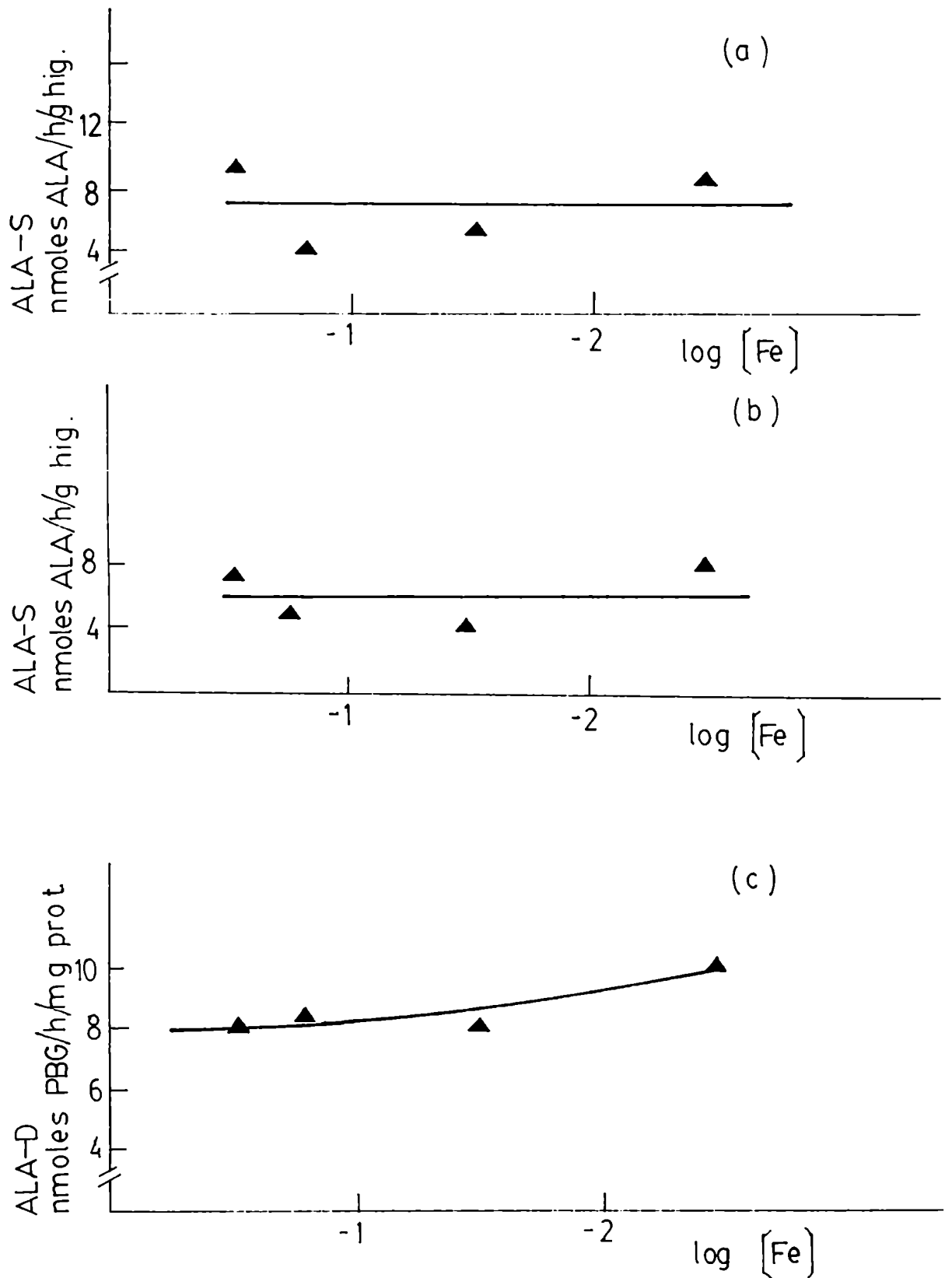
En las Figs. 73, 74 y 75 se graficaron las 2 etapas de descarboxilación de la Uro-D. La 1a. etapa que es el pasaje de U → F y la 2a. que es la aparición de C.

La adición de ferritina no produce inhibición de la enzima en ninguna de las 2 etapas (Fig. 73). El Fe inorgánico en una concentración 0.3 mM produce una inhibición de un 13% para la primera etapa y un 27% para la 2a. etapa; mientras que a concentraciones de 0.15 mM no produce inhibición (Fig. 74).

La hemina causa una inhibición de la enzima de un 21% para la 1a. etapa y de un 27% para la 2a. etapa cuando se adiciona en una concentración de 10^{-4} M mientras que cuando se añade en una concentración de 10^{-5} M se produce una inhibición de sólo 10% para ambas etapas (Fig. 75). La inhibición y determinación de actividad se rea-

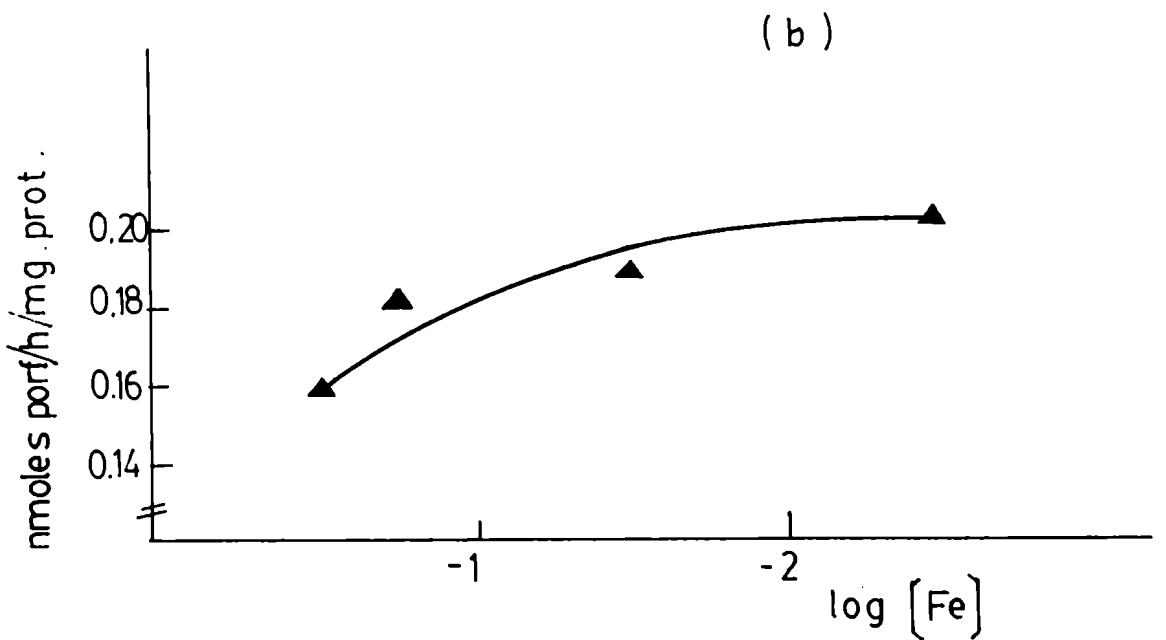
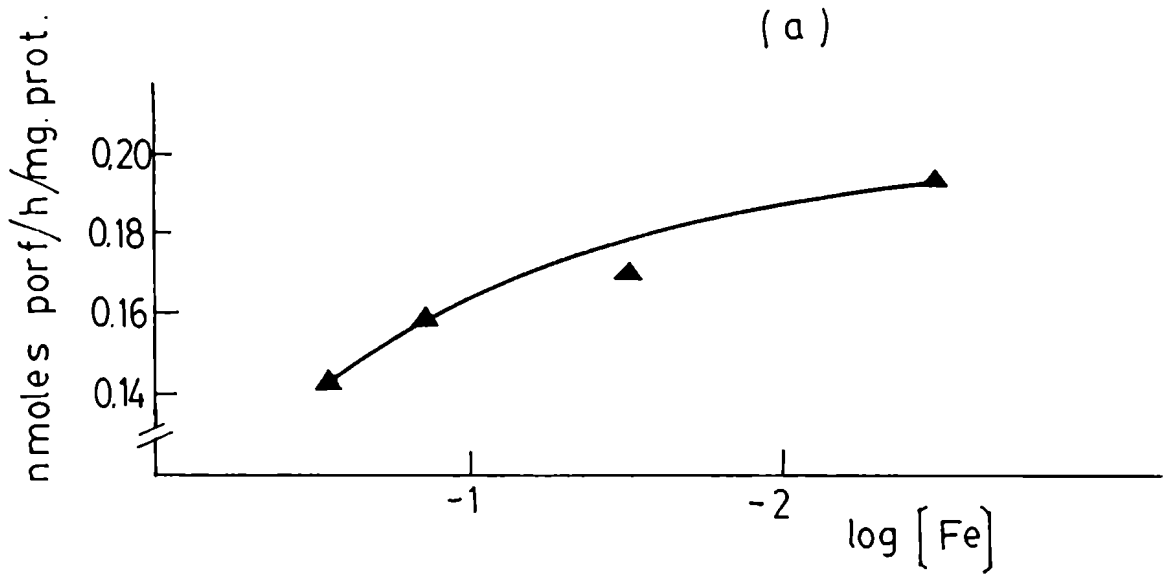
Fig.71

ACTIVIDAD DE ALA-S Y ALA-D CON EL AGREGADO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Fe INORGANICO AL MEDIO DE INCUBACION.



- (a) ALA S con agregado de Fe y Cy SH
- (b) ALA S con agregado de Fe sin C y SH
- (c) ALA D con agregado de Fe y Cy SH

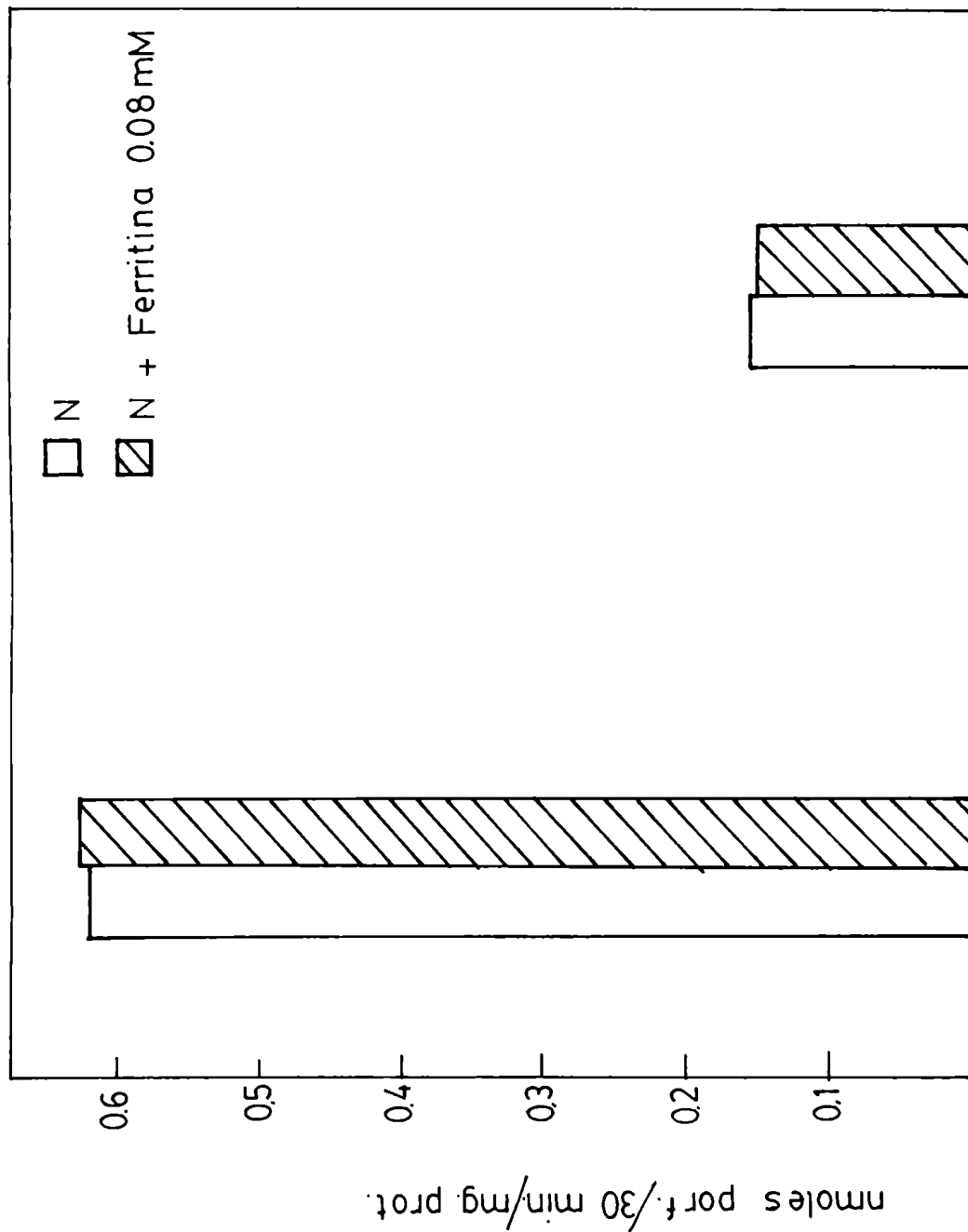
Fig. 72 ACTIVIDAD DE PBG-ASA CON EL AGREGADO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE Fe INORGANICO AL MEDIO DE INCUBACION



(a) PBG-ASA con el agregado de Fe y Cy SH

(b) PBG-ASA con el agregado de Fe sin Cy SH

EFECTO DE FERRITINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE URO-D NORMAL



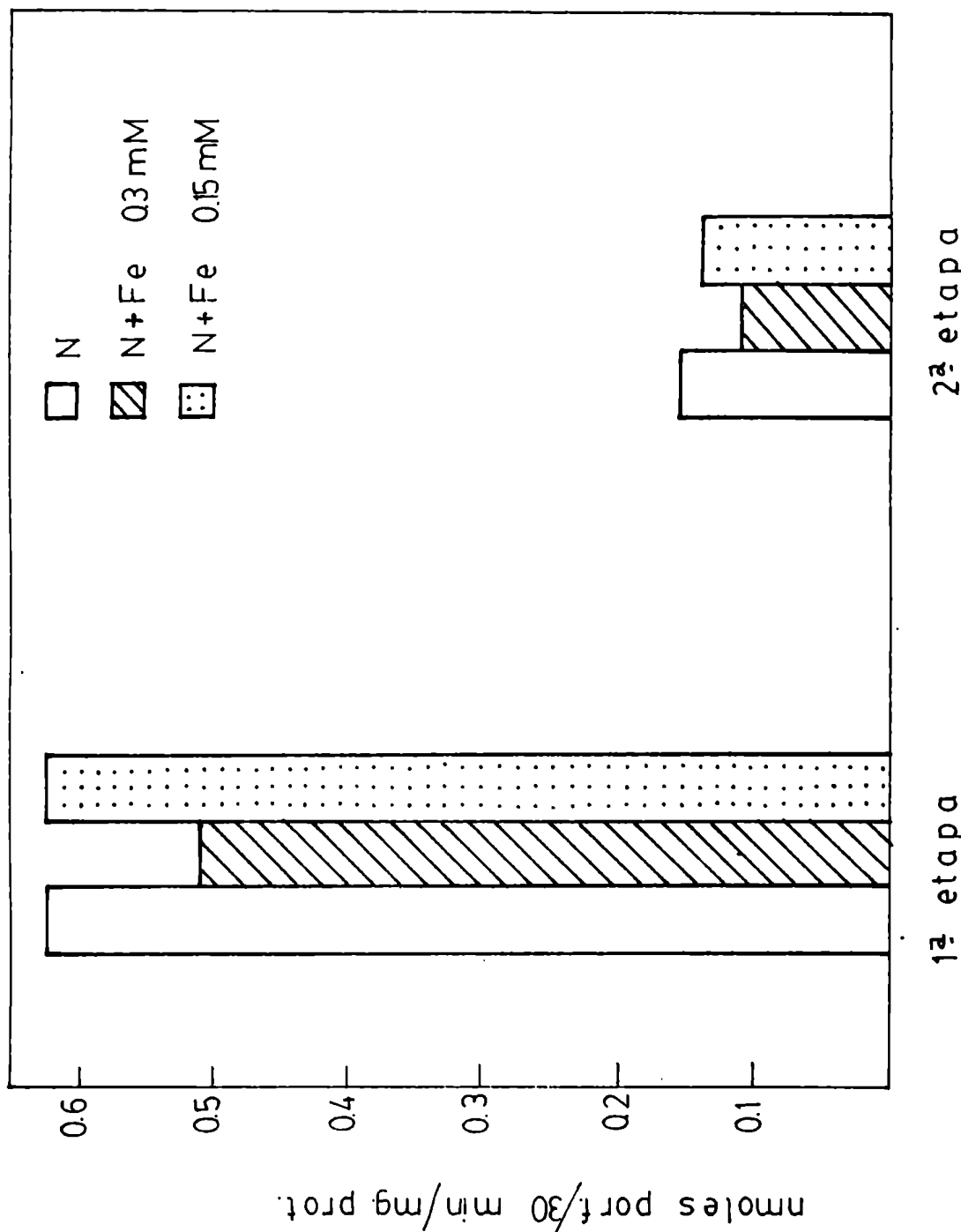
1ª etapa

2ª etapa

Las barras representan los promedios de las determinaciones enzimáticas de 3 animales. En la 1ª. etapa se mide el pasaje de $U \rightarrow F$ y en la 2ª. etapa la aparición de C. Las determinaciones enzimáticas se realizan como se indica en Métodos.

Fig. 73

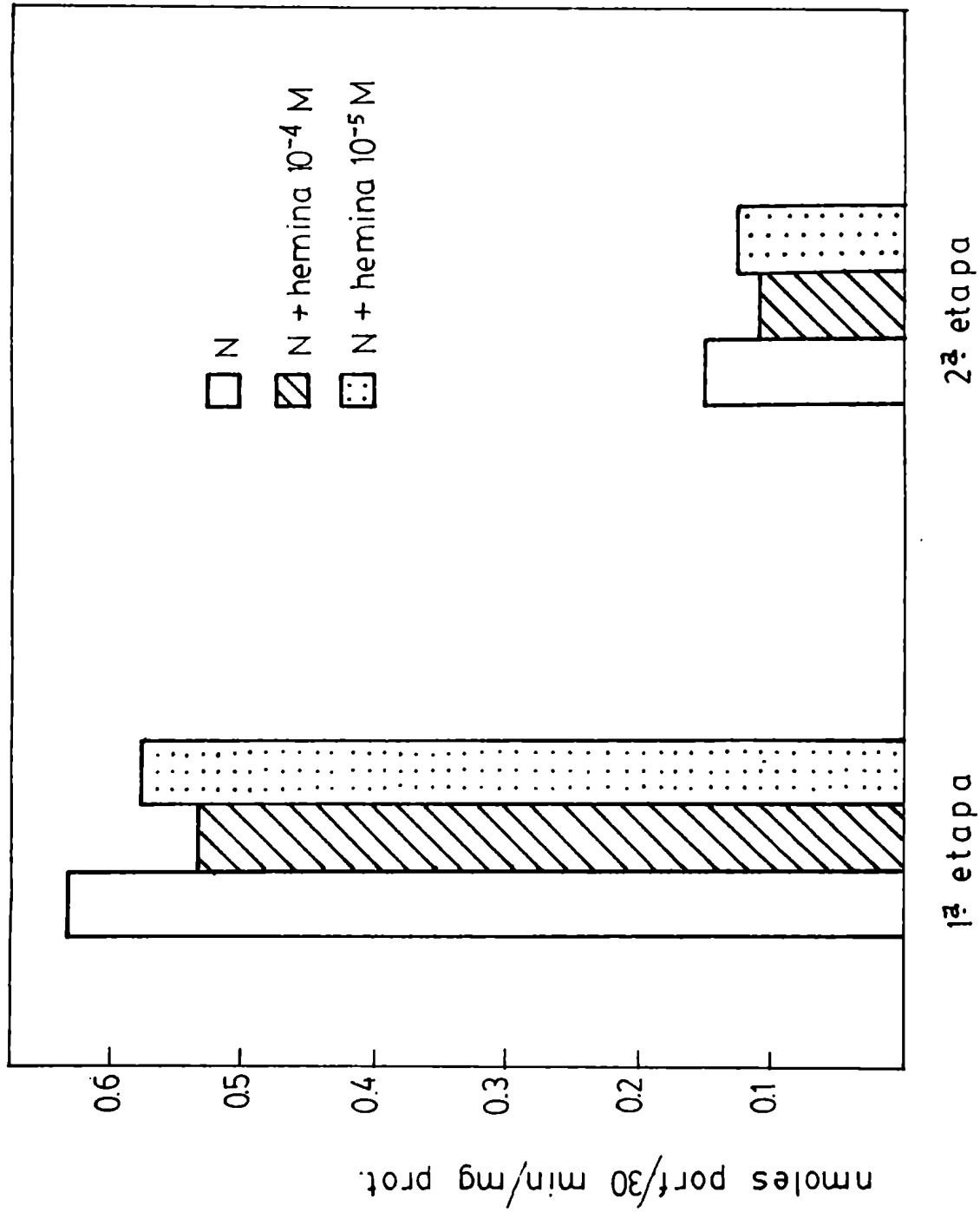
Fig. 74 EFECTO DE $\text{SO}_4 \text{ Fe}$ SOBRE LA ACTIVIDAD DE URO-D NORMAL.



Las barras representan los promedios de las determinaciones enzimáticas de 3 animales. En la 1ª. etapa se mide el pasaje de $\text{U} \rightarrow \text{F}$ y en la 2ª. etapa la aparición de C. Las determinaciones enzimáticas se realizan como se indica en Métodos.

Fig. 75

EFFECTO DE HEMINA SOBRE LA ACTIVIDAD DE URO-D NORMAL.



Las barras representan los promedios de las determinaciones enzimáticas de 3 animales. En la 1ª etapa se mide el pasaje de $U \rightarrow F$ y en la 2ª etapa la aparición de C. Las determinaciones enzimáticas se realizan como se indica en Métodos.

lizó como se detalla en Métodos.

Conclusiones.

- 1.- El HCB produce aumento del contenido de hierro total, aumento en el no hémico y disminución en el hémico en hígado de ratas, comparándole con animales normales.
- 2.- Al pasar sobrenadantes de 11.000 xg 20 min de homogenatos de hígado de ratas normales y porfíricas a través de columna de Sephadex G-25, se encontraron 2 picos para Fe total y Fe no hémico. Uno coincide con el pico de proteínas o sea sería Fe unido a proteínas; el otro sale con un volumen de elución mayor y correspondería por lo tanto a Fe libre. El Fe hémico sale en un solo pico que coincide con el de proteínas (Fig. 61). Midiendo las áreas correspondientes al Fe total (Fig. 59) se determina al igual que en a que la cantidad de Fe total es mayor para el hígado porfírico que para el normal.
- 3.- Se calculó la relación Fe/ proteína que se incorporaba en los ensayos de incubación para determinar la actividad de enzimas como PBG-asa y Uro-D para las cuales es necesario eliminar las porfirinas endógenas. Se determinó que la relación Fe total y no hémico respecto a proteínas era mayor para ratas intoxicadas con HCB respecto a normales y la relación Fe hémico respecto a proteínas era menor para dichos animales. En las determinaciones de PBG-asa y Uro-D aparentemente no se incluye Fe libre ya que este se elimina con la columna de Sephadex G-25 (Figs. 59 y 60). Esto sugeriría que los que podrían estar involucrados en el aumento de actividad de PBG-asa o en la disminución de Uro-D podría ser el aumento de Fe proteína o la disminución de Fe hémico pero no el aumento de Fe libre.

4.- La adición de quelantes "in vitro" no modifica las actividades enzimáticas de ALA-S, ALA-D y Uro-D. Sólo disminuye la actividad de la enzima porfírica PBG-asa en un 12% no modificando la de la normal.

5.- El agregado al medio de incubación de las distintas formas de Fe no produce activación de las actividades enzimáticas de ALA-S, ALA-D y PBG-asa, es decir no reproduce el efecto "in vivo" del HCB. Uro-D se ve inhibida a las concentraciones máximas ensayadas, las cuales superan la cantidad de Fe presente en un hígado porfírico (aprox. 0.15 mM). Es de destacar que aún así esta inhibición es mucho menor que la correspondiente a los ensayos "in vivo".

Teniendo en cuenta los resultados de los tópicos 4 y 5 se observa que para ALA-S y ALA-D la situación es clara e indicaría que el aumento de Fe no juega un papel directo "in vitro" en el aumento de las actividades de estas enzimas (las cuales están aumentadas en ratas porfíricas). En cuanto a PBG-asa y Uro-D los resultados referentes a quitar Fe y a agregarlo en sus distintas formas no se armonizan automáticamente y requieren de una discusión más amplia que se realiza en el capítulo correspondiente a Discusión.

DISCUSION

RESUMEN Y CONCLUSIONES.

DISCUSION.

El HCB, como ha sido detallado en la introducción de este trabajo, es un fungicida con propiedades porfirinogénicas que ha sido responsable de los miles de casos de porfiria humana de tipo Cutánea Tarda que aparecieron en Turquía en 1956 (107, 108) y que produce marcados disturbios en el metabolismo de porfirinas en diversos mamíferos (ratas, ratones, cobayos, conejos), pájaros silvestres y cultivo de células hepáticas de embrión de pollo (110-113).

El interés de los estudios con HCB en ratas radica en que la porfiria desarrollada en estos animales sirve de modelo experimental para el estudio de la PCT humana.

El objeto de esta investigación era elucidar el mecanismo de acción de esta droga en la producción de porfiria. Para ello se estudió el efecto de esta droga sobre diversas enzimas del camino metabólico del hemo, y sobre las excreciones urinarias de precursores y porfirinas.

Como primer paso se pusieron a punto los métodos para estas determinaciones tratando de hacer en lo posible un único homogenato en ClK 0,134 M para determinar simultáneamente las actividades de las enzimas estudiadas y otras aquí no detalladas.

Con respecto a esta parte del estudio cabe señalar que ALA-D cuando se homogeneiza en este medio presenta buena actividad en concordancia con los resultados de Gibson y col. (36). La actividad determinada en estas condiciones es del mismo orden que la lograda cuando se usa sa-

carosa como medio de homogeneización, medio utilizado por Ferramola (177) y Sancovich (178) para la determinación de actividad de ALA-D. La preincubación que se realiza, de 60 min. coincide con la efectuada por Gibson y col (36) y Sancovich (178).

En cuanto a PBG-asa se logró obtener una buena actividad enzimática homogeneizando con ClK 0.134 M e incubando con buffer PO_4HK_2/PO_4H_2K , obteniéndose un pH óptimo de 8.1. Con respecto al medio de homogeneización cabe mencionar que la actividad obtenida al homogeneizar con ClK 0.134 M fué superior a la lograda en sacarosa 0.25 M o en Tris-ClH 0.05 M, medios empleados comunmente para la estimación de esta actividad como informan Sancovich (178) y Llambías (179) entre otros.

En cuanto al pH es algo superior al obtenido por Sancovich (178) para la enzima de hígado bovino quien encuentra un pH óptimo de 7.4 para la enzima purificada trabajando con buffer Tris-ClH 0.05M, También es superior al obtenido por Llambías (179) en eritrocitos de pollo que obtiene un pH óptimo de 7.4.

En las incubaciones no se adicionó ni Na^+ ni Mg^{++} debido a que estos no tenían efecto o disminuían la actividad de la PBG-asa (disminuían la actividad a concentraciones mayores de 120 mM para Na^+ y mayores de 150 mM para Mg^{++}). Estos resultados difieren de los encontrados para hígado bovino (178) donde determinan que el Na^+ llega a activar a esta enzima y de los hallados para callos de semilla de soja (179) donde se obtiene que el Na^+ 3 mM y el Mg^{++} 0.6 mM producen un significativo aumento de actividad. en eritrocitos de pollo (179) en cambio el Na^+ no tiene efecto

en un amplio rango de concentraciones, En hígado bovino (178) el Mg^{++} produce inhibición a concentraciones mayores que 10 mM lo cual coincidiría con los resultados obtenidos en esta investigación. Por lo tanto, se puede deducir que el Mg^{++} no tienen efecto o disminuye la actividad de PBG-asa en hígado de rata, en hígado bovino (178) y en eritrocitos de pollo (179). El Na^+ produce una leve activación solo en hígado bovino (178) no teniendo efecto, o ejerciendo un efecto inhibitorio, dependiendo de la concentración, en los otros dos tejidos analizados. Ocurre lo contrario en callos de semilla de soya (179) donde ambos cationes producen activación.

Para poder determinar si el HCB actuaba através de alguno de sus metabolitos (100-103) se realizaron experimentos con FB (prototipo de compuesto que estimula el metabolismo microsomal de drogas (138)) HCB y ambas drogas al mismo tiempo.

En los lotes de animales intoxicados sólo con HCB se observa aumento en la excreción de ALA, PBG y porfirinas, lo cual concuerda con los trabajos de Ockner y Schmid (109), De Matteis y col. (110), San Martín de Viale y col. (113) y Elder y col. (123).

En el presente trabajo se analiza la excreción de ALA, PBG y porfirinas en función de las semanas de tratamiento observándose los picos de excreción de ALA a la 7a. semana de tratamiento, los de PBG entre la 7a. y 8a. y porfirinas comienza a elevarse entre la 4a. y 5a. semana de tratamiento. Taljaard y col. (153) también analiza la excreción de porfirinas en función de las semanas de tratamiento, pero comienzan a determinar elevación de las mismas a la 7a. semana. Estos últimos autores

administran el HCB en la dieta en una concentración de 0.3%, o sea en forma distinta a como se realizó en este trabajo que es por sonda gástrica.

En cuanto a la naturaleza de las porfirinas excretadas, se observa, al igual que Taljaard y col. (153) que las ratas normales excretan, en cuanto a porfirinas se refiere, sólo Copro. A medida que los animales ingieren HCB la cantidad de Copro en orina disminuye comenzando a ser cada vez mayor la cantidad de porfirinas con mayor número de carboxilos (Uro, Firia, Penta y Hexa).

Al analizar porfirinas en hígado se observa, al igual que otros investigadores (1-9, 110, 113-115) acumulación de las mismas en este órgano. Se determina que los animales drogados con HCB comienzan a acumular porfirinas a la 5a. semana de tratamiento mientras que Taljaard y col. (153) comienza a notar esta elevación recién a la 7a. semana de tratamiento.

La enzima ALA-S aumenta su actividad en el lote de animales intoxicados con HCB lo cual concuerda con los trabajos de Rajamanickan y col. (118), San Martín de Viale y col. (119), Taljaard y col. (153) y Wada y col. (120). Este último trabajo fué realizado en ratones mientras que los otros en ratas.

La actividad de la enzima ALA-D aumenta por tratamiento prolongado de las ratas con HCB. Estos resultados están de acuerdo con los hallados por San Martín de Viale y col. (119) pero no con los de Rajamanickam y col. (118) los cuales determinan que esta enzima disminuye por trata-

miento con HCB administrado en la dieta en una concentración de 0,2%. La disminución la determinan entre la 2a. y 4a. semana de tratamiento lo cual coincidiría en parte con los resultados experimentales de esta investigación ya que en la 3er. semana de tratamiento se determina una pequeña disminución en la actividad de esta enzima, Rajamanickam y col. (118) miden la actividad de esta enzima hasta la 4a. semana de tratamiento, y por ello posiblemente no pueden visualizar el aumento que luego ocurre.

Se determina que la enzima PBG-asa aumenta su actividad al intoxicar ratas con HCB, coincidiendo con lo observado por San Martín de Viale y col. (119). Se determina un drástico decremento de la enzima Uro-D en ratas con severa intoxicación con HCB, tanto para la primera como para la 2a. etapa. La enzima comienza a decrecer su actividad a la 3er. semana de tratamiento para llegar al máximo de decremento a la 8a. semana con un porcentaje de decremento del 85%. Este decremento de actividad de la Uro-D cuando los animales adquieren severa porfiria coincide con los trabajos de San Martín de Viale y col. (115) y con el de Elder y col. (123). Este último utiliza Penta'gen III como sustrato, Taljaard y col. (125), por el contrario utilizando Uro'gen III como sustrato no halla disminución de Uro-D en ratas intoxicadas con HCB. Observan disminución de la actividad de esta enzima sólo cuando los animales son sideróticos, o sea cuando junto con HCB se les administra Fe.

Todas estas enzimas se midieron en función de las semanas de tratamiento observándose que la primera que se afecta es Uro-D a la 3er.

semana de tratamiento, luego le sigue ALA-S a la 5a. semana y luego ALA-D después de la 5a. semana.

Al mismo tiempo que se analizaron precursores, porfirinas y enzimas para el lote de animales intoxicados con HCB, también se determinaron los mismos parámetros para el lote FB, FB + HCB y N. Los animales que ingerían FB en el agua de bebida (1 g/l) mostraron valores de excreción de precursores y porfirinas en orina y acumulación de porfirinas en hígado que coincidían con las excreciones y acumulación del lote de animales normales.

El FB por sí sólo tampoco aumenta la actividad de la enzima ALA-S, lo cual estaría en concordancia con los resultados de Kaufman y col. (138) y de Wada y col. (120) quienes administran FB por inyección intraperitoneal en dosis de 80 mg/kg. El primero trabaja con ratas e inyecta FB cada 24 hs durante 5 días mientras que el segundo trabaja con ratones y administra FB cada 12 hs (4 inyecciones). Los resultados de Tephly y col. (142) y de Manchanahalli y col. (141) no concuerdan con los de esta investigación ya que encuentran aumento de actividad de ALA-S en ratas después de inyectar intraperitonealmente FB en dosis de 40 mg/kg y 80 mg/kg respectivamente. Tephly y col. (142) administra el FB cada 24 hs dando 5 dosis. Encuentra máxima activación de la enzima después de la primer dosis y de allí comienza a bajar la actividad pero no llega a valores normales. Manchanahalli y col (141) administran la droga también cada 24 hs pero dan sólo 2 dosis, observando por lo tanto activación pero no determinando ninguna disminución respecto a este pico de activi-

dad máxima ya que no siguen midiendo a tiempos más largos.

En la presente investigación la administración de FB se realiza en forma distinta, ya que se incluye en el agua de bebida. Además la medición de actividad de las enzimas se realiza después de ingerir FB por períodos de tiempo mucho más largos que los determinados por otros investigadores, (120, 138, 141, 142) ya que las primeras mediciones de actividades enzimáticas se realizan después de 14 días de administración continua de FB.

La actividad de las enzimas ALA-D y Uro-D disminuyen por la administración de FB cuando se utiliza como fuente enzimática sobrenadante de 11.000 g. Cuando se utiliza como fuente enzimática sobrenadante de 105.000 g las actividades enzimáticas de ALA-D y Uro-D, coincide con los valores correspondientes a los controles normales. Esta disminución de actividad, no se debe por lo tanto a un efecto inhibitorio del FB sobre dichas enzimas sino a una "dilución" de la enzima debido a un incremento de proteínas microsomales provocada por esta droga.

Todos los disturbios provocados por el HCB en el camino metabólico del hemo que fueron analizados previamente se vieron incrementados y anticipados en el tiempo cuando se administra junto con HCB, FB o sea las dos drogas al mismo tiempo. El adelanto en la excreción urinaria de porfirinas en los animales intoxicados con FB + HCB coincide con los resultados de Debets y col, (180) y de Kerklaan y col. (181), pero estos autores obtienen aumento de porfirinas recién a la 8a. semana de tratamiento al administrar HCB en el alimento en una proporción de 0.1% y FB

en el agua de bebida en una proporción de 0,5 g/l y 1 g/l respectivamente. Es de destacar que en la presente investigación los animales comienzan a excretar porfirinas a la 4a. semana de tratamiento con FB + HCB (HCB por sonda gástrica y FB 1 g/l en el agua de bebida), debiéndose posiblemente la diferencia a la distinta forma de administración del HCB y a una distinta susceptibilidad de los animales para adquirir porfiria pese a ser ambos hembras cepa Wistar.

Del análisis de los resultados de estos experimentos surge que el HCB se metaboliza, transformándose en metabolito/s activo, el cual produciría los disturbios en el camino metabólico del hemo mencionados anteriormente y sería por lo tanto el responsable de la producción de porfiria por HCB.

Para averiguar la acción de dicho metabolito "in vitro", se realizaron los ensayos cruzados y de calentamiento. Estos ensayos indicarían que no existe un activador en la preparación porfírica que active la enzima normal, en el caso de ALA-S y ALA-D, por lo tanto el aumento de estas actividades observadas "in vivo" como consecuencia de la intoxicación por HCB no podría explicarse por un fenómeno de activación. Habría que pensar entonces en una acción del metabolito a nivel de síntesis proteica.

En el caso de la PBG-asa y de la Uro-D el incremento y descenso respectivamente de las actividades enzimáticas de las mismas producidas por el HCB "in vivo" podrían deberse en parte a un activador e inhibidor respectivamente presentes en la preparación enzimática porfírica a juzgar por los ensayos cruzados y de calentamiento. La diferencia entre el in-

cremento o disminución producida "in vivo" (50% para PBG-asa y 80% para Uro-D (Fig. 43) y la activación o inhibición producida por el agregado de las preparaciones porfíricas calentadas y sin calentar sobre las preparaciones normales (20% para PBG-asa (Tablas IX y XIII) y 50% para Uro-D (Tabla X)) podría deberse a un fenómeno a nivel de síntesis proteica.

Dicho activador no sería ni HCB ni PCF ya que el HCB no tiene ningún efecto y su metabolito PCF no produce activación a ninguna de las concentraciones ensayadas, para ALA-S, ALA-D y PBG-asa.

Si bien el PCF ejerce una acción inhibitoria directa sobre la Uro-D, lo realiza a concentraciones mayores que $10^{-5}M$, lo cual implicaría que la concentración originada en el hígado por la metabolización del HCB debería ser mayor que $10^{-5}M$ para que este compuesto pueda ejercer un efecto inhibitorio directo sobre la Uro-D. La cantidad de PCF encontrada en hígado de humanos (128) intoxicados con esta droga, correspondería a $10^{-5}M$ en el medio de incubación de los ensayos enzimáticos para determinar Uro-D. Por otra parte Debets y col. (183) determinaron que la concentración de PCF en el hígado de ratas intoxicadas con HCB durante 4 a 8 semanas de tratamiento es de aproximadamente $20 \mu g/g$ de hígado. Esta concentración de PCF en el hígado representaría una concentración de $10^{-6}M$ de esta droga en el medio de incubación para determinar actividad de Uro-D. Considerando los resultados obtenidos en esta investigación y los datos obtenidos de bibliografía acerca de la concentración de PCF en el hígado de humanos y animales intoxicados con HCB se deduciría que el PCF

no tendría un efecto directo sobre la Uro-D ya que produce inhibición de esta enzima sólo a concentraciones mayores que 10^{-5} M en el medio de incubación para determinar Uro-D.

La disminución de la actividad de Uro-D por la acción del HCB "in vivo" podría deberse por lo tanto a una acción de metabolitos a nivel de síntesis proteica; o al efecto inhibitorio directo sobre la enzima, ejercido por la acción conjunta de varios metabolitos.

La administración de PCF técnico a ratas produjo en estos animales un cuadro de porfiria similar al producto por administración de HCB. Esto podría sugerir que el PCF podría ser el metabolito responsable de la porfiria por HCB. Pero cuando se administra PCF purificado por períodos de tiempo mayores que PCF técnico no se observa modificación en los parámetros estudiados. Esto indicaría que la porfiria producida por PCF técnico en ratas se debería posiblemente a la presencia de contaminantes, en concordancia con el trabajo de Goldstein y col. (182) y Debets y col. (183).

Por otro lado, el PCF purificado eleva la acumulación de porfirinas y la actividad de ALA-S en hígado de embriones de pollo. Esta respuesta diferente a la misma droga en distintas especies de animales puede deberse a diferencias en el sistema de metabolización de drogas (184).

Para investigar el rol del Fe en la porfiria experimental por HCB en ratas se determinó primeramente el contenido de Fe en hígado en estos animales.

Así se observa que el Fe total está aumentado, el hémico disminuido y el no hémico aumentado. Saunders y col. (185) encuentran también aumento de Fe en hígado en ratas intoxicadas con HCB.

El aumento del Fe no hémico coincide con el hecho de que Smith y col. (154) hayan demostrado que una cepa de ratas marcadamente susceptible a los efectos del HCB tenía un contenido de Fe no hémico hepático superior al de otra cepa menos susceptible.

Elder y col. (121) encuentran por el contrario una leve disminución en el contenido de Fe no hémico cuando lo miden en ug/g de hígado en ratas intoxicadas con HCB, pero los hígados de éstas aumentan también de tamaño, concluyendo por lo tanto que no hay diferencias significativas entre la cantidad total de Fe no hémico en los hígados de los 2 grupos de animales, o sea entre los controles y los intoxicados con HCB.

Los resultados obtenidos con quelantes indican que la adición de estos "in vitro" no modifica las actividades enzimáticas de ALA-S, ALA-D y Uro-D. La PBG-asa de hígado porfírico ve disminuída en un 12% su actividad pero no hay modificación de la enzima normal.

Cuando se agrega Fe en sus distintas formas al medio de incubación no se produce activación de ALA-S, ALA-D y PBG-asa, es decir no se reproduce el efecto "in vivo", del HCB. Uro-D se ve inhibida sólo a las concentraciones máximas ensayadas. Estas concentraciones de Fe en el medio de incubación superan la cantidad de Fe presente en un hígado porfírico,

pero pese a ello esta inhibición es mucho menor que la correspondiente a los ensayos "in vivo".

Por tanto los resultados obtenidos "in vitro" con la adición de quelantes y la adición de Fe en sus distintas formas indicarían que el Fe no es el responsable directo del aumento de la ALA-S y ALA-D que se observa en ratas intoxicadas con HCB. No se encontró inhibición de ALA-S por hemina, lo cual está de acuerdo con los resultados observados por Meyer y col. (32) en homogenatos de hígado entero.

La falta de inhibición de ALA-S por hemina a 10^{-5} y 10^{-4} M podría indicar que no existe tal inhibición o bien que la concentración endógena de hemo de la preparación enzimática (10^{-5} M, calculada a partir de los resultados de Fe hémico) provee una cantidad tal como para inhibir la ALA-S. Por tanto la actividad no disminuye por un agregado exógeno. Con respecto a la acción de hemina sobre ALA-S, Scholnick y col. (24) y Whiting y col. (22) entre otros, informan que hemina 10^{-4} y 10^{-5} M produce inhibición por feed back en preparaciones enzimáticas purificadas de hígado de rata, mientras que Wolfson y col. (186) trabajando con mitocondrias intactas de hígado de rata, concluyen que la inhibición por feed back no parecería ser un mecanismo fisiológico importante en la regulación de este camino metabólico en hígado. El mecanismo importante sería la represión por hemina que ha sido observada a concentraciones de hemina de 10^{-7} a 10^{-8} M (33, 187).

Es de destacar que PBG-asa es la única enzima de las cuatro estudia-

das que modifica en parte su actividad al realizar los ensayos cruzados, de calentamiento y por el agregado de quelantes al medio de incubación, pero no aumenta su actividad por el agregado de Fe en sus distintas formas en el medio de incubación. Esto último no estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por Kushner y col. (150) ya que estos encuentran activación de la PBG-asa de hígado de cerdo tanto al adicionar $\text{SO}_4\text{Fe}(\text{NH}_4)_2$ o ferritina al medio de incubación. El descenso de actividad al adicionar $\text{SO}_4\text{Fe}(\text{NH}_4)_2$ observado en este trabajo no se debería al ion NH_4^+ ya que este no es inhibidor de la PBG-asa a las concentraciones aquí ensayadas (188), descartándose por lo tanto la posible interferencia de éste. Por lo tanto para esta enzima los resultados obtenidos con quelantes parecerían no armonizarse con los del agregado de Fe inorgánico. Para explicar estos resultados cabrían 2 hipótesis:

- 1) Que Fe-metabolito (Fe unido de algún modo a metabolito) sea el activador de la PBG-asa en el hígado porfírico (Fe que el quelante es capaz de retirar bajando en un cierto porcentaje la activación de la enzima) y que sea el Fe sólo el que produce inhibición en la PBG-asa de hígado normal. Como aclaración al efecto de los quelantes se podría decir que la activación en presencia de quelantes baja un poco pero sigue habiendo activación, eso implicaría:
 - a) Que el quelante no es suficiente para remover todo el Fe. A lo mejor la contribución del Fe en la activación de PBG-asa puede ser mayor que el 12% observado pero sin llegar al 100% o sea sin llegar a ser el único responsable.

- b) Que el Fe además de ejercer su efecto a nivel de activar la PBG-asa, mediante la acción metabolito-Fe podría ser que modifique la cantidad de enzima formada, actúe a nivel de síntesis proteica.
- 2) Otra explicación podría ser que cuando se está sintetizando la PBG-asa, el Fe que está aumentado en el porfírico, se inserte en determinados lugares en el interior de la estructura tridimensional de la proteína y actúe activando la enzima. Al poner quelantes se retira ese Fe y baja la actividad. En cambio al agregar Fe a una enzima normal ya sintetizada la ubicación de estos átomos de Fe podría ser distinta; podría ser que se unan de tal forma que baje la actividad de la enzima.

Con estas consideraciones se concluye que si el Fe tiene algún efecto a nivel de actividad enzimática en las primeras enzimas del camino del hemo, parece ejercerlo a través de la PBG-asa, pero de todas maneras el efecto producido representaría aproximadamente 1/5 del efecto producido "in vivo" por el HCB. Parecería que el efecto del Fe sobre ALA-S y ALA-D involucraría síntesis proteica ya que no se pudo detectar ninguna activación en ensayos cruzados, de calentamiento o por el agregado de Fe inorgánico, Fe-proteína (ferritina) o hemina. En concordancia con estos encuentros cabe mencionar los resultados de Stein y col. (149) quienes sugieren que el Fe aumenta la velocidad de síntesis de la enzima ALA-S durante la inducción por AIA o DDC más que en la activación o estabilización de la misma.

En cuanto a la enzima Uro-D se encuentra inhibición en los ensayos por calentamiento pero no en los cruzados lo cual indicaría que el inhi-

bidor estaría pegado a la enzima porfírica y no podría actuar de esta forma sobre la enzima normal o que se despegaría de la enzima porfírica y se pegaría en cantidades equivalentes a la enzima normal inhibiendo por lo tanto a la normal pero dejando de actuar sobre la porfírica, no variando de esta forma el porcentaje de decremento de la enzima porfírica respecto a la normal. La adición de quelantes no tiene efecto y el Fe inorgánico provoca inhibición adicionado a concentraciones mayores que las correspondientes a un hígado porfírico (aproximadamente 0.15 mM en el medio de incubación. Por lo tanto si bien a concentraciones mayores que 0.15mM existe un efecto inhibitorio, no tendría significado fisiológico, es decir la concentración de Fe en un hígado porfírico no podría explicar el descenso de actividad de Uro-D observada en el mismo. La adición de hemina al medio de incubación provoca también inhibición a concentraciones mayores que las correspondientes al Fe hémico de un hígado porfírico (las concentraciones de Fe hémico para un hígado porfírico corresponderían a 10^{-5} M en el medio de incubación), Con todas estas consideraciones se concluye que la disminución de Uro-D observada "in vivo" no puede explicarse por un efecto directo "in vitro" del Fe sobre la enzima. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por Kushner y col. (151) y por Blekkenhorst y col. (189). Los primeros (151) obtenían inhibición de la enzima incubando con concentraciones de Fe entre 0,08 y 0.3 mM en el medio de incubación, realizando una preincubación con Fe y CySH y utilizando como sustrato ^3H Uro'gen I. En la presente investigación, en cambio, no se obtiene inhibi-

ción de la enzima en el rango de concentraciones entre 0,08 y 0,15 mM, obteniéndose una pequeña inhibición sólo a 0,3 mM. Los segundos (189) obtienen activación de la enzima incubando directamente con Fe, generando Uro'gen I a partir de ^{14}C -PBG y PBG-deaminasa. La inhibición de Uro-D hallada por Kushner y col. (151) y producida por Fe en concentraciones menores que las halladas en este trabajo podría deberse por un lado a la preincubación realizada por ellos y por otro lado a un efecto combinado del Fe y del NH_4^+ ya que Kushner y col. (151) agregan Fe al medio de incubación en forma de $(\text{SO}_4)_2\text{Fe}(\text{NH}_4)_2$. En la presente investigación no se adiciona NH_4^+ ya que se trabaja con SO_4Fe .

Los resultados obtenidos "in vitro" respecto a que el Fe divalente no tiene efecto sobre la Uro-D estarían de acuerdo con los ensayos in vivo (125, 190) acerca de que la siderosis hepática "per se" no afecta la actividad de Uro-D hepática en ratas.

Considerando que el HCB se metaboliza lo podría realizar a través del citocromo P-450 y del citocromo P-448 (180, 191). Al medir concentración de citocromo P-450 en ratas intoxicadas con FB, HCB y FB + HCB (192) se observó que en los animales intoxicados con HCB la concentración de citocromo aumenta en las primeras semanas de tratamiento para luego llegar a valores normales. Cuando se agregan las dos drogas al mismo tiempo estos efectos se ven incrementados y anticipados en el tiempo, al igual que lo hallado en el presente trabajo para excreción de precursores y porfirinas, acumulación de porfirinas en hígado y actividad de ALA-S, ALA-D y Uro-D.

Resumiendo, los resultados empleando FB, estimulador del metabolis-

mo microsomal de drogas, avalarían la hipótesis de que HCB da metabolito activo (Fig. 76) el cual es el responsable de los disturbios provocados en el camino del hemo, lo cual concuerda con trabajos previos de nuestro laboratorio (194, 195) y con los de Kerklaan y col. (181). En esta figura las flechas hacia arriba o hacia abajo a la derecha de cada enzima indican el aumento o disminución de las mismas en los animales intoxicados con HCB.

En la misma figura se observa que el metabolito no actuaría en forma directa sobre ALA-S ni sobre ALA-D ya que no se observa activación de la enzima normal por la enzima porfírica en los ensayos cruzados y en los ensayos de calentamiento. El Fe tampoco actuaría en forma directa sobre estas enzimas, pues no se observa variación de actividad en los ensayos con quelantes y en los de adición de Fe en sus distintas formas. El aumento de actividad de estas enzimas que se observa en los animales intoxicados con HCB, se debería por lo tanto a la acción de metabolitos a nivel de síntesis de proteínas. En cuanto a la PBG-asa existiría un activador que podría ser Fe unido a metabolito el cual podría actuar en forma directa sobre la enzima, lo cual se visualiza en la flecha que va de metabolito a PBG-asa en la Fig. 76. El metabolito y el Fe contribuirían sólo a aumentar un 20% de la actividad de la enzima, correspondiendo el 30% restante de aumento de actividad de la misma a la acción de metabolitos a nivel de síntesis proteica ya que esta enzima presenta un aumento de actividad de un 50%. La acción directa del metabolito y del Fe sobre dicha enzima se deduce de la activación de la enzima normal observado en los ensayos cruza-

dos y de calentamiento y del decremento de la activación de la enzima porfírica en los ensayos con quelantes.

La acción directa del metabolito y del Fe sobre la Uro-D, se indica con la flecha de línea quebrada en la Fig. 76 ya que a través de los ensayos cruzados no se observa inhibición de la enzima normal por la enzima porfírica. Tampoco aumenta la actividad de la enzima porfírica al añadir quelantes. Tanto el Fe y el PCF inhiben la enzima normal pero solo cuando se adicionan en concentraciones superiores a las correspondientes a un hígado porfírico. El ensayo que nos haría pensar en la acción directa del metabolito y/o el Fe sobre esta enzima sería el de calentamiento con el cual se obtuvo un 50% de inhibición de la enzima normal al añadir el desproteinizado porfírico. Si existe inhibición en forma directa del metabolito sobre la Uro-D, de todos modos ésta no da cuenta de la inhibición producida "in vivo" por el HCB y por lo tanto el metabolito debería actuar también modificando la enzima a nivel de síntesis de proteínas.

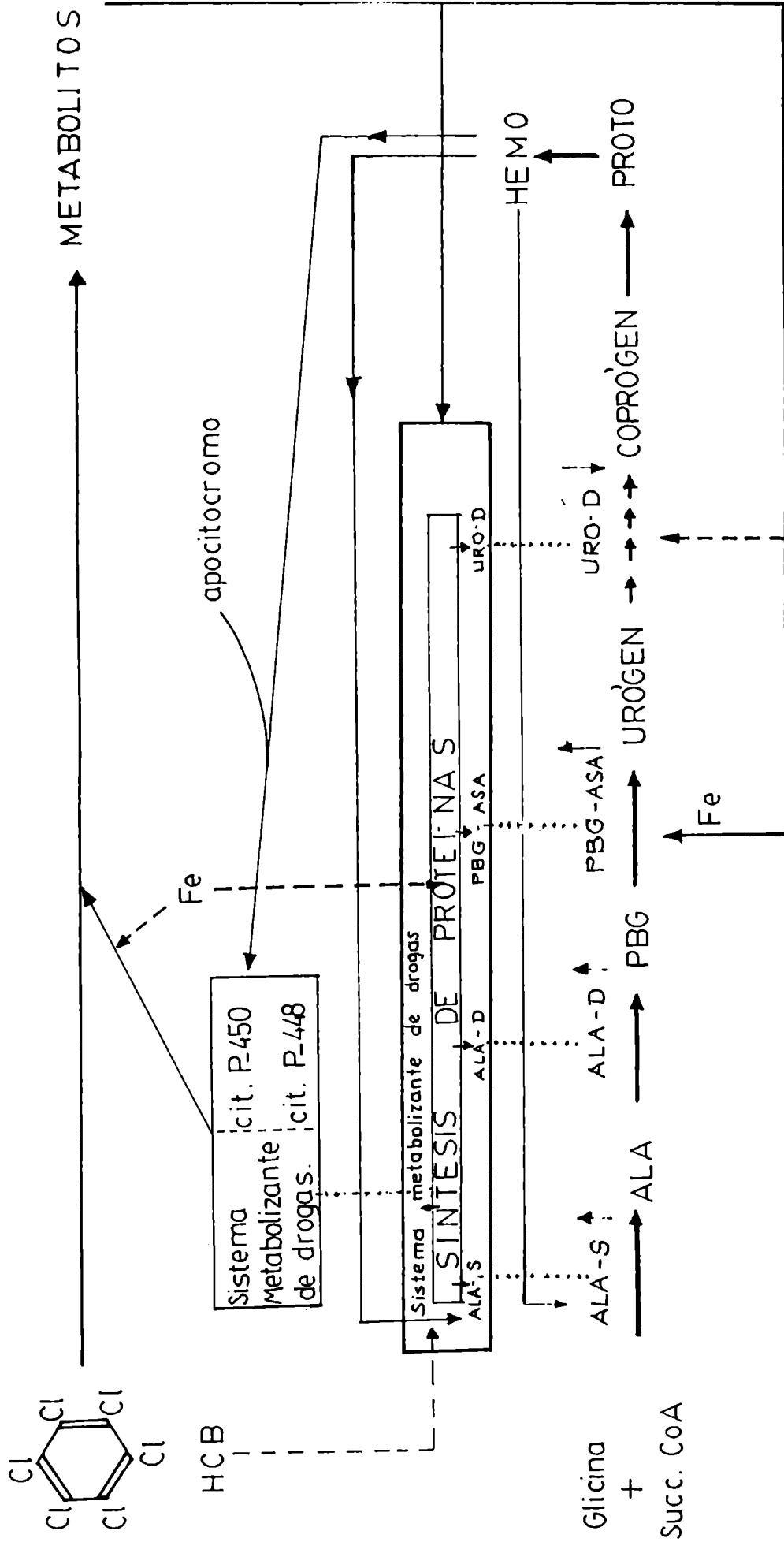
Los resultados obtenidos con citocromo P-450 indicarían que HCB induce a este citocromo el cual metabolizaría al HCB dando un metabolito reactivo. Si bien el PCF es el metabolito del HCB que se ha hallado en mayor cantidad parecería no ser el responsable directo de la producción de porfiria por HCB ya que el PCF puro sólo, no es porfirinogénico. Sin embargo podría jugar un papel indirecto, incrementando los efectos porfirinogénicos del HCB como lo sugieren Debets y col. (183). Estos investigadores informan que la administración de HCB junto con PCF causa un aumento de varias enzimas del sistema metabolizante de drogas y una acumulación de PCF en el hígado superior a la observada cuando los animales se

tratan con HCB y PCF separadamente, Observan además, que el PCF acelera el comienzo del estado de porfiria producido por HCB, o sea incrementa la excreción de porfirinas urinarias totales y causa un disturbio más temprano en la naturaleza de las mismas.

Por lo tanto la acción porfirinogénica del HCB no podría deberse sólo al PCF, que parecería jugar un papel indirecto sino a la acción combinada de algún o algunos de los otros metabolitos del HCB.

Los resultados obtenidos con Fe indican que si bien éste, podría intervenir unido a un metabolito (Fig. 76) en forma directa sobre la enzima PBG-asa (es la única enzima de hígado porfírico que disminuye su actividad con el agregado de quelantes) no podría descartarse su efecto a nivel de la síntesis de las proteínas enzimáticas ALA-S, ALA-D, PBG-asa y Uro-D. El Fe podría también estar involucrado en otra etapa de la producción de esta porfiria, en la etapa HCB → metabolito como lo han propuesto Sinclair y col. (148) y como se muestra en el esquema de la Fig. 76.

Fig. 76



RESUMEN Y CONCLUSIONES.

El presente trabajo tiene por objetivos:

- Elucidar si el hexaclorobenceno (HCB) produce la porfiria "per se" o a través de un metabolito.
- Investigar si el HCB o el metabolito ejercen su acción sobre las actividades de las enzimas del hemo (ALA-sintetasa (ALA-S), ALA-dehidrasa (ALA-D), porfobilinogenasa (PBG-asa) y Uroporfirinógeno decarboxilasa (Uro-D) o si más bien afectarían la síntesis de dichas proteínas.
- Evaluar si el pentaclorofenol (PCF) es o no uno de los metabolitos a través del cual el HCB ejerce sus efectos porfirinogénicos.
- Aportar datos tendientes a elucidar el papel del hierro en la producción de esta porfiria.

Los resultados y conclusiones obtenidas son las siguientes:

- 1.- Se determinan las condiciones óptimas de ensayo para medir ALA, PBG y porfirinas en una única muestra de orina, como así también las actividades de las enzimas ALA-sintetasa (ALA-S), ALA-dehidrasa (ALA-D) y porfobilinogenasa (PBG-asa), en hígados de ratas normales e intoxicadas con hexaclorobenceno (HCB), utilizando para ALA-D y PBG-asa el mismo homogenato que para Uro-D.
- 2.- Para investigar si la producción de porfiria por HCB en ratas, es debido a esta droga "per se" a alguno de sus metabolitos se realiza un

estudio de pretratamiento de los animales con fenobarbital (FB), inductor del metabolismo de drogas.

3.- En todos los casos se analiza el estado de porfiria en ratas en función de las semanas de tratamiento midiéndose distintos parámetros:

a) Se determina el peso del hígado respecto al peso de rata en los cuatro lotes de animales, normal (N), FB, HCB y FB + HCB y se observa que dicha relación aumenta por el tratamiento con FB, con HCB y con ambas drogas administradas al mismo tiempo. La relación del peso del hígado al peso del cuerpo del animal tiene el siguiente orden: FB + HCB > HCB > FB > N.

b) Se mide ALA, PBG y porfirinas excretadas por orina en los cuatro lotes y se determina que en los animales drogados con FB + HCB los picos de excreción de ALA y PBG y la excreción de porfirinas antecede en 2 semanas a las de los tratados sólo con HCB. Los picos de excreción de ALA y PBG son además mayores en los animales que reciben ambas drogas al mismo tiempo. En los animales tratados sólo con FB los valores de excreciones de precursores y porfirinas caen dentro del rango de valores normales.

c) Las porfirinas urinarias excretadas están formadas sólo por Copro en ratas normales mientras que en animales intoxicados con HCB se excreta sólo Copro hasta la 4a. semana de tratamiento; en la 5a. hay una disminución de la proporción de Copro a expensas del aumento de la proporción de Uro, Firia, Penta y Hexa.

En los animales que reciben ambas drogas, FB y HCB al mismo

tiempo, se observa una disminución de Copro a expensas de las otras porfirinas a la 3er. semana de tratamiento, o sea el disturbio en la naturaleza de porfirinas urinarias excretadas comienza una semana antes. Durante las siguientes semanas de tratamiento la cantidad de Copro sigue disminuyendo a expensas de las otras porfirinas más carboxiladas hasta adquirir una porfiria definida donde la cantidad de Copro para el lote HCB es del 47% y para el lote FB + HCB 34%.

Los animales intoxicados sólo con FB excretan al igual que los normales unicamente Copro y acumulan porfirinas en cantidades normales.

- d) Se mide acumulación de porfirinas en hígado en los cuatro lotes de animales y se determina que el pretratamiento con FB causa una acumulación de porfirinas más temprana y mayor que cuando el HCB se administra sólo. Así la acumulación observada para el lote FB + HCB antecede en 2 semanas y supera al del HCB sólo.
- e) Se determina actividad de ALA-S, ALA-D y Uro-D en los cuatro lotes de animales en función de las semanas de tratamiento. Se observa que la actividad de ALA-S comienza a elevarse a la 3er. semana de tratamiento para el lote FB + HCB mientras que lo realiza a la 5a. para el lote HCB sólo. La actividad de ALA-D se eleva a la 5a. semana para el lote de animales que ingieren ambas drogas y después de la 5a. semana para el lote de animales que ingiere HCB sólo. Uro-D descende significativamente su actividad en la 3er. semana tanto

para el lote FB + HCB como para HCB sólo pero el descenso es mayor cuando se dan ambas drogas al mismo tiempo que cuando se administra HCB sólo.

- f) Se realizan ensayos para medir actividad de ALA-D y Uro-D a 11000g y a 105.000 g y se comparan los resultados de ambas centrifugaciones. Esto se realiza para determinar si el descenso de actividad de estas enzimas para los animales del lote drogado sólo con FB es debido a la acción de dicha droga sobre la enzima o a un aumento de las proteínas microsomales producida por este compuesto.

Se determina que los valores de actividad específica de estas dos enzimas dan menores que los normales cuando se centrifugan los homogenatos a 11.000 g, debido a un aumento de proteínas microsomales y no a la acción del FB sobre dichas enzimas.

- 4.- Los experimentos de pretratamiento con FB, indican pues que los efectos provocados por el HCB se ven incrementados y anticipados en el tiempo cuando se administra junto con HCB, FB o sea las dos drogas al mismo tiempo.
- 5.- Los resultados obtenidos de este estudio indicarían que los disturbios producidos en el metabolismo de porfirinas por el HCB "in vivo" no se deberían a la droga "per se" sino más bien a la acción de alguno de sus metabolitos.
- 6.- Para investigar si dicho metabolito actúa directamente sobre las enzimas ALA-S, ALA-D, PBG-asa y Uro-D, aumentando la actividad de las tres primeras y disminuyendo la actividad de la última, se realizan:

- a) Ensayos cruzados entre la enzima normal y la correspondiente enzima porfírica,
- b) Ensayos con preparaciones calentadas, en los cuales se adiciona un homogenato o sobrenadante de homogenato de hígado porfírico por HCB y desproteínizado por calentamiento sobre una preparación de enzima normal.

En estos casos se determinan los efectos sobre las actividades de las enzimas ALA-S, ALA-D, PBG-asa y Uro-D.

7.- Los ensayos cruzados y los de calentamiento indicarían que no existe un activador en la preparación porfírica que active la enzima normal para el caso de ALA-S y ALA-D. Aparentemente el incremento de actividad de estas enzimas producida por la intoxicación por HCB se debería a una acción de los metabolitos en la maquinaria de la síntesis de estas proteínas enzimáticas.

En el caso de PBG-asa, en cambio, estos ensayos sugerirían la presencia de un activador para dicha enzima.

En cuanto a la Uro-D los ensayos de calentamiento muestran una inhibición de la enzima normal por la enzima porfírica calentada lo cual indicaría la presencia de un inhibidor que no se pudo confirmar a través de los ensayos cruzados ya que al agregar una preparación porfírica sin calentar no se observa inhibición de la enzima normal.

Los efectos observados sobre PBG-asa y Uro-D normales son menores que los producidos por el HCB "in vivo", pudiendo ser atribuida la diferencia a un fenómeno a nivel de síntesis proteica.

8.- Se realizan ensayos "in vitro" con HCB y PCF sobre las enzimas ALA-S, ALA-D, PBG-asa y Uro-D. Con estas drogas no se pudo reproducir "in vitro" el efecto que produce el HCB administrado "in vivo". O sea ALA-S, ALA-D y PBG-asa no incrementan su actividad por adición de HCB o de PCF "in vitro". En cuanto a Uro-D, el HCB no la afecta mientras que el PCF la inhibe sólo cuando se adiciona en el medio de incubación en concentraciones mayores que 10^{-5} M. Es de destacar que esta concentración superaría a la concentración de PCF detectada en el hígado de ratas intoxicadas con HCB, que correspondería a 10^{-6} M en el medio de incubación para determinar actividad de Uro-D.

9.- Se administra PCF técnico y purificado a ratas durante 16 y 26 semanas respectivamente.

La droga técnica produce un disturbio en el metabolismo de porfirinas semejante al producido por HCB, determinándose:

- a) Incremento en los niveles de excreción de precursores y porfirinas en el siguiente orden: porfirinas \succ PBG \succ ALA. Los picos de excreción se encuentran aproximadamente entre la 15a. y 16a. semana de tratamiento.
- b) Se produce acumulación de porfirinas en hígado, riñón y bazo, siendo el que más acumula el hígado, obteniéndose un valor promedio de 970 μ g/g, le sigue el riñón y luego el bazo.
- c) Incremento de ALA-S (2.5 veces) y drástico decremento (98%) de Uro-D.

10.- El PCF purificado, en ratas, no modifica significativamente los parámetros estudiados, mientras que en embriones de pollo produce aumento

en la acumulación de porfirinas en hígado y en la actividad de ALA-S hepática.

- 11.- Se miden las concentraciones de los distintos tipos de Fe en hígado de ratas normales y en intoxicadas con HCB. Se determina que en los animales intoxicados, el Fe total y el Fe no hémico aumentan y el hémico disminuye.
- 12.- Para determinar si el aumento de la concentración de Fe en los hígados de animales intoxicados, es el responsable de los disturbios provocados en las enzimas, se adicionan quelantes al medio de incubación para retirar Fe del mismo. Por otro lado se adiciona Fe en distintas formas (Fe inorgánico, ferritina y hemina) al medio de incubación de preparaciones enzimáticas normales.
- 13.- Se observa que el aumento de Fe no juega un papel directo "in vitro" en el aumento de las actividades de las enzimas ALA-S, ALA-D y Uro-D. El Fe ejercería un efecto directo "in vitro" sólo sobre la PBG-asa, siendo su contribución sólo de 1/5 sobre el aumento total de esta enzima provocado por el HCB "in vivo".
- 14.- Se concluye que el HCB ejerce su acción porfirinogénica a través de un metabolito. El PCF, principal metabolito del HCB parecería no ser el responsable directo de la producción de porfiria por HCB ya que cuando se administra sólo no produce porfiria. Sin embargo podría jugar un papel indirecto ya que incrementa los efectos porfirinogénicos del HCB cuando se administran ambas drogas en conjunto.

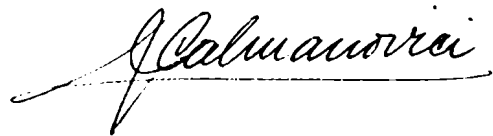
Por lo tanto la acción porfirinogénica del HCB no podría deberse

sólo al PCF sino a la acción combinada de algún o algunos de los otros metabolitos del HCB.

El Fe podría intervenir en la producción de esta porfiria en la etapa de metabolización del HCB, favoreciendo la producción de metabolitos o incrementando la acción de estos últimos uniéndose a ellos.



DRA. L. C. SAN MARTIN DE VIALE



BIBLIOGRAFIA.

- 1.- SHEMIN D. y RUSSELL CH. S., J. Am. Chem. Soc., 75 (1953) 4873.
- 2.- SHEMIN D., Ergeb. Physiol., 49 (1957) 299.
- 3.- SHEMIN D. y WITTENBERG J., J. Biol. Chem., 192 (1951) 315.
- 4.- GIBSON K.D., LAVER W. G. y NEUBERGER A., Biochem. J., 70 (1958) 71.
- 5.- KIKUCHI G., KUMAR A., TALMAGE P. y SHEMIN D., J. Biol. Chem., 233 (1958) 1214.
- 6.- LASCELLES J., Biochem. J., 66 (1957) 65.
- 7.- BURNHAM B. F., Semin. Hematol., 5 (1968) 296.
- 8.- AKHTAR M. y JORDAN P. M., Chem. Commun., 24 (1968) 1691.
- 9.- AKHTAR M., ABBOUD M., BARNARD G., JORDAN P. y ZAMAN Z., Philos. Trans. R. Soc. Lond., 273 (1976) 117.
- 10.- JORDAN P. M. y AKHTAR M., Biochem. J., 116 (1970) 277.
- 11.- BROWN E. G., Biochem. J., 70 (1958) 313.
- 12.- KIKUCHI G., SHEMIN D. y BACHMAN B. J., Biochim. Biophys. Acta, 28 (1958) 219.
- 13.- BURNHAM B. F. y LASCELLES J., Biochem. J., 87 (1963) 462.
- 14.- NARISAWA K. y KIKUCHI G., Biochim. Biophys. Acta, 99 (1965) 580.
- 15.- FELDMAN F. y LICHTMAN H. C., Biochim. Biophys. Acta, 141 (1967) 653.
- 16.- TOMIO J. M. y GRINSTEIN M., Eur. J. Biochem., 6 (1968) 80.
- 17.- WIDER DE XIFRA .E.A., BATLLE A.M. DEL C. y TIGIER H.A., Biochim. Biophys. Acta, 235 (1971) 511.
- 18.- MARVER H.S., TSCHUDY D.P., PERLROTH M.G. y COLLINS A., J. Biol. Chem., 241 (1966) 2803.
- 19.- SANO S. y GRANICK S., J. Biol. Chem., 236 (1961) 1173.
- 20.- GRANICK S., Trans. N.Y. Acad. Sci., Ser. II 25 (1962) 53.
- 21.- HAYASHI N., YODA B. y KIKUCHI G., J. Biochem., 67 (1970) 859.
- 22.- WHITING M. J. y ELLIOTT W.H., J. Biol. Chem., 247 (1972) 6818.
- 23.- GRANICK S. y URATA G., J. Biol. Chem., 238 (1963) 821.
- 24.- SCHOLNICK P. L., HAMMAKER L.E. y MARVER H. S., J. Biol. Chem., 247 (1972) 4132.
- 25.- SCHOLNICK P. L., HAMMAKER L.E. y MARVER H. S., J. Biol. Chem., 247 (1972) 4126.
- 26.- SCHOLNICK P. L., HAMMAKER L.E. y MARVER H. S., Proc. Natl. Acad. Sci., 63 (1969) 65.

- 27.- NAKAKUKI M., YAMAUCHI K., HAYASHI N. y KIKUCHI G., J. Biol. Chem. 255- (1980) 1738.
- 28.- OHASHI A. y KIKUCHI G., Biochem. J., 85 (1979) 239.
- 29.- SIMPSON D. M. y BEATTIE D., J. Biol. Chem. 255, (1980) 1630.
- 30.- OHASHI A. y KIKUCHI G., Arch. Biochem. Biophys. 153 (1972) 34.
- 31.- YAMAUCHI K., HAYASHI N. y KIKUCHI G., J. Biol. Chem., 255(1980) 1746.
- 32.- MEYER U.A. y SCHMID R., The metabolic basis of inherited diseases. J. B. Stanbury et al. Eds. Mc. Graw-Hill. New York (1980) 1166.
- 33.- SINCLAIR P. R. y GRANICK S., Ann. N. Y. Acad. Sci., 244 (1975) 509.
- 34.- JACOB F. y MONOD J., Symp. Quant. Biol., 26 (1961) 193.
- 35.- KURASHIMA Y., HAYASHI N. y KIKUCHI G., J. Biochem. 67 (1979) 863.
- 36.- GIBSON K. D., NEUBERGER A. y SCOTT J.J., Biochem. J., 61 (1955) 618.
- 37.- BATLLE A. M. DEL C., FERRAMOLA A. M. y GRINSTEIN M., Biochem. J. 104 (1967) 244.
- 38.- NANDI D. L. y SHEMIN D., Biochem. Biophys. Acta, 158 (1973) 305.
- 39.- SCHMID R. y SHEMIN D., J. Am. Chem. Soc., 77 (1955) 506.
- 40.- GRANICK S. y MAUZERALL D., J. Biol. Chem., 232 (1958) 1119.
- 41.- COLEMAN D. L., J. Biol. Chem., 241 (1966) 5511.
- 42.- CHEN A. y NEILANDS, Biochem. Biophys. Res. Commun., 55 (1973) 1060.
- 43.- DOYLE D., J. Biol. Chem., 246 (1971) 4965.
- 44.- WILSON E. L., BURGER P. E. y DOWDLE E. B., Eur. J. Biochem. 29 (1972)563.
- 45.- WU W. H., SHEMIN D., RICHARDS K. E. y WILLIAMS R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71 (1974).1767.
- 46.- DESPAUX N., COMOY E., BOHUON C. y BOUDENE C., Biochimie, 61 (9) (1979) 1021 Eng.
- 47.- NANDI D.L. y SHEMIN D., J. Biol. Chem., 243 (1968) 1236.
- 48.- BARNARD G. F., ITHOH R., HOHBERGER L. H. y SHEMIN D., J. Biol. Chem., 252 (1977) 8965.
- 49.- BATLLE M. DEL C. y STELLA A. M. Int. J. Biochem. 9 (1978) 861.
- 50.- CORNFORD P., Biochem. J., 91 (1964) 64.
- 51.- LLAMBIAS E. B. C. y BATLLE A. M. DEL C. , Biochem. J. 121 (1971) 327.
- 52.- LLAMBIAS E. B. C. y BATLLE A. M. DEL C. , Biochim. Biophys. Acta 227 (1971)180.
- 53.- BATLLE A. M. DEL C. y GRINSTEIN M., Biochim. Biophys. Acta, 82 (1964) 1.
- 54.- BATTERSBY A. R. y MC DONALD E., Acc. Chem. Res., 12 (1979) 14.
- 55.- CARPENTER A. T. y SCOTT J.J., Biochim. Biophys. Acta, 52 (1961) 195.

- 56.- BATTERSBY A. R., GIBSON K. H., MC DONALD E., MANDER L. N., MORON J. y NIXON L. N., J. Chem. Soc. Chem. Commun., (1973) 768.
- 57.- FRYDMAN R. B., REIL S. y FRYDMAN B., Biochemistry, 10 (1971) 1154.
- 58.- VALASINAS A., LEVY E. S. y FRYDMAN B., J. Org. Chem. 39 (1974) 2872.
- 59.- FRYDMAN R. B., VALASINAS A., LEVY S. y FRYDMAN B., FEBS Lett., 38(1974)134.
- 60.- BATTERSBY A. R., FOOKES CH. J. R., MARCHAN G. W. J. y MC DONALD E., J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1978) 1064.
- 61.- SCOTT A. I., BURTON G. y FAGERNESS P. E., J. Chem. Soc. Chem. Soc.(1979)199.
- 62.- SCOTT A. I., J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1979) 202.
- 63.- JORDAN P. M., BURTON G., NORDLOV H. SCHNEIDER M. N., RRIJDE L. y SCOTT A. I., J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1979) 204.
- 64.- BATTERSBY A. R., FOOKES CH. J. R., GUSTAFSON - POTTER K. E., MATCHAM G. W. J. y MC DONALD E., J. C. S. Chem. Comm. (1979) 1155.
- 65.- LOCKWOOD W. H. y RIMINGTON C., Biochem. J., 67 8P (1957).
- 66.- SHEMIN D., ABRAMSKY T. y RUSELL C. S., J. Amer. Chem. Soc. 76 (1954) 1204.
- 67.- BATLLE A. M. DEL C. y GRINSTEIN M., Biochim. Biophys. Acta, 62 (1962) 197.
- 68.- GARCIA R. C., SAN MARTIN DE VIALE L. C., TOMIO J. M. y GRINSTEIN M., Biochim. Biophys. Acta, 309 (1973) 203.
- 69.- SAN MARTIN DE VIALE L. C., RIOS DE MOLINA M. DEL C., WAINSTOK DE CALMANOVICI R. y TOMIO J. M., First Int. Porphyrin Meet., Porphyrins in Human Diseases (Edited by Doss M.) pag. 445. Karger, Basel.
- 70.- ROMEO G. y LEVIN E. Y., Biochim. Biophys. Acta, 230 (1971) 330.
- 71.- HOARE D. S. y HEATH H., Nature, 181 (1958) 1592.
- 72.- MAUZERALL D. y GRANICK S., J. Biol. Chem. 232 (1958) 1141.
- 73.- BOGORAD L. y GRANICK S., Proc. Natl. Acad. Sci. 39 (1953) 1176.
- 74.- SANCOVICH H. A., Synthetic and Biosynthetic studies of Uroporphirinogen-III Metabolism, Ph. D. Thesis University College, Cardiff, 1979.
- 75.- TSCHUDY D. P., J. Am. Med. Ass. 191 (1965) 114.
- 76.- ELDER G. H., Iron Excess, Aberrations of Iron and Porphyrin Metabolism (Edited by Muller-Eberhard U., Miescher P. A. y Jaffé E. R.) pag. 227.
- 77.- JACKSON A. H., GAMES D. E., COUCH P., JACKSON J. R., BELCHER R. B. y SMITH S. G., Enzyme, 17 (1974) 81.
- 78.- BATLLE A. M. DEL C., BENSON A. y RIMINGTON C., Biochem. J., 97 (1965) 731.
- 79.- POULSON R. y POLGLASE W. J., J. Biol. Chem., 249 (1974) 6367.
- 80.- ELDER G. H. y EVANS J. O., Biochem. J. 172 (1978) 345.
- 81.- CAVALEIRO J. A. S., KENNER G. W. y SMITH K. M., J. C. S. Perkin I, (1974)531.

- 82.- SANO S., J. Biol. Chem., 241 (1966) 5276.
- 83.- CAVALEIRO J. A. S., KENNER G. W. y SMITH K. M., J. C. S. Chem. Com., 183(1973).
- 84.- HEIKEL T., LOCKWOOD W. H. y RIMINGTON C., Nature 182 (1958) 313.
- 85.- LABBE R. F., HUBBARD N., CAUGHEY W. S., Biochemistry 2 (1963) 372.
- 86.- PORRA R. J. y JONES O. T. G., Biochem. J., 87 (1963) 181.
- 87.- DAILEY H. A. y LASCELLES J., Arch. Biochem. Biophys. 160 (1974) 523.
- 88.- GRANICK S., Fed. Proc. 13 (1954) 219.
- 89.- PORRA R. J. y JONES O. T. G., Biochem. J. 87 (1963) 186.
- 90.- JONES O. T. G., Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 (1967) 671.
- 91.- JONES O. T. G., Biochem. J. 107 (1968) 113.
- 92.- PORRA R. J. y LASCELLES J., Biochem. J. 108 (1968) 343.
- 93.- HELMEYER L., CLOTTEN R. y HEILMEYER L., Disturbances in Heme Synthesis, Thomas Ch. C., Springfield, JLL (1966).
- 94.- DOSS M. y SCHERMULY E. First. Int. Porphyrin Meet., Porphyrins in Human Diseases (Edited by Doss M.) pag. 189. Karger, Basel.
- 95.- KUSHNER J. P., BARBUTO A. J. y LEE G. R., J. Clin. Invest. 58 (1976) 1089.
- 96.- ELDER G. H., PATH M. R. C., LEE G. B. y TOVEY J. A. N. Engl. J. Med. 299 (1978) 274.
- 97.- SANBORN J. R., CHILDERS W. F., HANSEN L. G., J. Agric. Food Chem. 25 (1977) 551.
- 98.- PARKE D. V. y WILLIAMS R. T., Biochem. J., 74 (1960) 5.
- 99.- LUI H. y SWEENEY D., FEBS Lett., 51 (1975) 225.
- 100.- MEHENDALE H. M., FIELDS M. y MATTHEWS H. B., J. Agr. Food. Chem. 23(1975)261.
- 101.- KÓSZÓ F., SIKLÓSI Cs. y SIMON N., Biochem. Biophys. Res. Commun., 80(1978)781.
- 102.- KOSS G., KORANSKY W. y STEINBACH K., Arch. Toxicol. 35 (1976) 107.
- 103.- KOSS G. First Int. Porphyrin Meet., Porphyrins in Human Diseases (Edited by Doss M.) pag. 414. Karger, Basel (1975).
- 104.- KOSS G., KORANSKY W. y STEINBACH K., Arch. Toxicol. 42 (1979) 19.
- 105.- KOSS G., SEUBERT S., SEUBERT A., KORANSKY W., KRAUS P. y IPPEN H., Int. J. Biochem. 12 (1980) 1003.
- 106.- DEBETS F. M. H. y STRIK J. J. T. W. A. Chemical Porphyrin in Man. Edited by Strik J. J. T. W. A. y Koeman J. H. Elsevier. North-Holland Biomedical Press Amsterdam. New York. Oxford (1979) 193.
- 107.- CETINGIL A. I. y OZEN M. A., Blood, 16 (1960) 1002.
- 108.- CAM C. y NIGOGOSYAN G., J. Am. Med. Assoc. 183 (1963) 90.
- 109.- OCKNER R. K. y SCHMID R. Nature 189 (1961) 499.

- 110.- DE MATTEIS F., PRIOR B. E. y RIMINGTON C., Nature 191 (1961) 363.
- 111.- GRANICK S., J. Biol. Chem. 241 (1966) 1359.
- 112.- VOS J. G., VAN DER MAAS H. L., MUSCH A. y RAM E., Toxicol. and Appl. Pharmac. 18 (1971) 944.
- 113.- SAN MARTIN DE VIALE L. C., VIALE A. A., NACHT S. y GRINSTEIN M., Clin. Chim. Acta 28 (1970) 13.
- 114.- GAJDOS A. y GAJDOS-TÖRÖK M., Rev. Franc. Etudes Clin. Biol., 6(1961) 549.
- 115.- SAN MARTIN DE VIALE L. C., RIOS DE MOLINA M. DEL C., WAINSTOK DE CALMANOVICI R. y TOMIO J. M., Biochem. J. 168 (1977) 393.
- 116.- TIMME A. H., TALJAARD J. J. F., SHANLEY B. C. y JOUBERT S. M., S. Afr. Med. J., 48 (1974) 1833.
- 117.- DAY R. S., BLEKKENHORST G. H. y EALES L., Int. J. Biochem. 12 (1980) 1007.
- 118.- RAJAMANICKAM C., AMRUTAVALLI J., RAO M. R. S. y PADMANABAN G., Biochem. J. 129 (1972) 381.
- 119.- SAN MARTIN DE VIALE L. C., TOMIO J. M., FERRAMOLA A.M., SANCOVICH H. A. y TIGIER H. A., First. Int. Porphyrin Meet. Porphyrin in Human Diseases (Edited by Doss M.) pag. 453, Karger, Basel.
- 120.- WADA O., YANO Y., URATA G. y NAKAO K., Biochem. Pharmacol. 17 (1968) 595.
- 121.- ELDER G. H., EVANS J. O. y MATLIN S., First. Int. Porphyrin Meet. Porphyrin in Human Diseases (Edited by Doss M.) pag. 424. Karger, Basel.
- 122.- BLEKKENHORST G. H., DAY R. S. y EALES L., Int. J. Biochem. 12 (1980) 1013.
- 123.- ELDER G. H., EVANS J. O. y MATLIN S. A., Clin. Sci. Mol. Med. 51 (1976) 71.
- 124.- TALJAARD J. J. F., SHANLEY B. C. y JOUBERT S. M., Life Sci. 10 (1971) 887.
- 125.- TALJAARD J. J. F., SHANLEY B. C., DEPPE W. M. y JOUBERT S. M., Brit. J. Haematol., 23 (1972) 587.
- 126.- The Merck Index of chemicals and drugs. Edited by Stecher P. G., Finkel M. J., Siegmund O. H. y Szafranski B. M. (1960) 779.
- 127.- ARRHENIUS E., RENBERG L. y JOHANSSON L., Chem. Biol. Interact. 18(1977) 23.
- 128.- HALEY T. J., Ecotoxicol. Envir. Safety 1 (1977) 343.
- 129.- BARTHEL W. F., CURLEY A., THRASHER C. L., SEDLAK V. A. y ARMSTRONG R. J. AOAC 52 (1969) 294.
- 130.- BAADER H. C. E. W. y BAUER H. J., Ind. Med. Surg. 20 (1951) 286.
- 131.- GLICKMAN A. H., STATHAM CH. N., WU A. y LECH J. J., Toxicol. Appl. Pharmacol. 41 (1977) 649.
- 132.- PEET R. L., MAC DONALD G. y KEEPE A., Aust. Vet. J. 53 (1977) 602.
- 133.- MUNRO I. B. y OSTLER D. C., Vet. Record, 101 (1977) 525.
- 134.- AHLBORG U. G., LINDGREN J. E. y MERCIER M., Arch. Toxicol. 32 (1974) 271.

- 135.- JAKOBSON I. y YLLNES S., Acta Pharmacol. et. Toxicol. 29 (1971) 513.
- 136.- BETTS J. J., JAMES S. P. y THORPE W. V., Biochem. J. 61 (1955) 611.
- 137.- DEICHMANN W., MACHLE W., KITZMILLER K. V. y THOMAS G., J. Pharmac. Exp. Therap. 76 (1942) 105.
- 138.- KAUFMAN L., SWANSON A. L. y MARVER S., Science 170 (1970) 320.
- 139.- BARON J. y TEPHLY T. R., Mol. Pharmacol. 5 (1969) 10.
- 140.- GRANICK S. J. Biol. Chem. 241 (1966) 1369.
- 141.- MANCHANAHALLI R., SATYANARAYANA RAO y GOVINDARAJAN PADMANABAN, Biochem. J. 134 (1973) 859.
- 142.- TEPHLY T. R., HASEGAWA E. y BARON J., Metabolism., 20 (1971) 200.
- 143.- GOVINDARAJAN PADMANABAN, MANCHANAHALLI R., SATYANARAYANA RAO y KRISHNAMACHARI MALATHI, Biochem. J. 134 (1973) 847.
- 144.- MEYER U. A. y MARVER H. S., Science 171 (1971) 64.
- 145.- HASEGAWA E., SMITH C. y TEPHLY T. R., Biochem. Biophys. Res. Commun., 40 (1970) 517.
- 146.- DE MATTEIS F. y STONARD M., Semin. Hematol. 14 (1977) 187.
- 147.- KUSHNER J. P. y BARBUTO A. J., Clin. Res. 23 (1975) 403.
- 148.- SINCLAIR P. R. y GRANICK S. Biochem. Biophys. Res. Commun, 61 (1974) 124.
- 149.- STEIN J. A., TSCHUDY D. P., CORCORAN P. L. y COLLINS A., J. Biol. Chem. 245 (1970) 2213.
- 150.- KUSHNER J. P., LEE G. R. y NACHT S., J. Clin. Invest. 51 (1972) 3044.
- 151.- KUSHNER J. P., STEINMULLER D. P. y LEE G. R., J. Clin. Invest. 56 (1975) 661.
- 152.- LOUW M., NEETHLING A. C., PERCY V. A. , CARSTENS M. y SHANLEY B. C., Clin. Sci. Mol. Med. 51 (1976) 71.
- 153.- TALJAARD J. J. F., SHANLEY B. C., DEPPE W. M. y JOUBERT S. M., Brit. J. Haematol. 23 (1972) 513.
- 154.- SMITH A. G., CABRAL J. R. P. y DE MATTEIS F., Chem. Biol. Interact. 27 (1979) 353.
- 155.- LIEM H., SMITH A. y MULLER-EBERHARD U., Biochem. Pharmacol., 28(1979)1753.
- 156.- WHITE J. N. H., WHITE J. A., LIEM H. H. y MULLER-EBERHARD U., Biochem. Pharmacol., 27 (1978) 865.
- 157.- BECKING G. C., Biochem. Pharmacol., 21 (1972) 1585.
- 158.- SWEENEY G. D., JONES K. G., COLE F. M., BASFORD D. y KRESTYNSKY F., Science 204 (1979) 332.
- 159.- RACZ W.J. y MARKS G.S., Biochem. Pharmacol., 18 (1969) 2009.
- 160.- KALTER S. S., Procedures for Routine Laboratory Diagnosis of Virus and Rickettsial Diseases (1963) 6. Burgess Publishing Co, Minneapolis.

- 161.- RIMINGTON C. y SVEINSSON S. L., Scand. J. Clin. Lab. Invest., 2(1950) 209.
- 162.- TOMIO J. M., GARCIA R. C., SAN MARTIN DE VIALE L. C. y GRINSTEIN M., Biochim. Biophys. Acta, 198 (1970) 353.
- 163.- TOMIO J. M. y SAN MARTIN DE VIALE L. C., Bioq. Clin., 6 (1972) 217.
- 164.- MAUZERALL D. y GRANICK S., J. Biol. Chem. 219 (1956) 435.
- 165.- FALK J. E. y BENSON A., Biochem. J. 55 (1953) 101.
- 166.- SALUM J., BATLLE A. M. DEL C. y GRINSTEIN M., Anales Asoc. Quim. Arg., 49 (1961) 3.
- 167.- CORNFORD P. A. D. y BENSON A., J. Chromatography 10 (1963) 141.
- 168.- NICHOLAS R. E., Biochem. J. 48 (1951) 309.
- 169.- SAN MARTIN DE VIALE L. C. Biosíntesis del hemo. Purificación y caracterización de las porfirinas urinarias en porfiria humana y experimental. Porfirinógenos de 5- y 6- COOH (isómero III) como intermediarios normales en la biosíntesis del hemo. Tesis Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.N.B.A.) 1970.
- 170.- FISHER H. y STERN A., Die Chemie des Pyrroles, Leipzig, 2 pt. 2 (1940) 420.
- 171.- E. B. SANDELL, Colorimetric Determination of Traces of Metals 3 (1959) 541. Editado por Clarke B. L., Elving P. J. y Kolthoff I. M.
- 172.- RAMSAY W. N. M. , Biochem. J. 53 (1953) 227.
- 173.- FALK J. E., Porphyrins and Metalloporphyrins, 2 (1964) 181. Elsevier, Amsterdam.
- 174.- RIFKIND A. B., GILLETTE P. N., SONG CH. S. y KAPPAS A., J. Pharmacol. exp. Ther. 185 (1973) 214.
- 175.- MOORE D. J. y LABBE R. F., Clin. Chem. 10 (1964) 1105.
- 176.- LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. y RANDALL R. J., J. Biol. Chem., 193 (1951) 265.
- 177.- FERRAMOLA A. M., Estudios sobre la transformación enzimática del ácido δ -amino levúlico en porfobilinógeno. Tesis Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.N.B.A.) 1972.
- 178.- SANCOVICH H. A., Estudios sobre la Biosíntesis de Uroporfirinógenos. Tesis Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.N.B.A.) 1972.
- 179.- LLAMBIAS E. B., Investigaciones sobre la conversión enzimática de porfobilinógeno en uroporfirinógenos. Tesis Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (U.N.B.A.) 1971.
- 180.- DEBETS M. H., Contribution to the elucidation of the mechanism of hepatic porphyria induced by hexachlorobenzene and related polyhalogenated hydrocarbons. Tesis. Agricultural University Wageningen. The Netherlands (1981) 72.

- 181.- KERKLAAN P. R. M., STRIK J. J. T. W. A. y KOFMAN J. H., Chemical porphyria in man, Elsevier, North Holland, Amsterdam, (1979) 151.
- 182.- GOLDSTEIN J. A., FRIESEN M., LINDER R. E., HICKMAN P., HASS J. R. y BERGMAN H., Biochem. Pharmac. 26 (1977) 1549.
- 183.- DEBETS F. M. H., STRIK J. J. T. W. A. y OLIE K., Toxicology 15 (1980) 181.
- 184.- TAUB H., KRUPA V. y MARKS G., Biochem. Pharmac., 25 (1976) 511.
- 185.- SAUNDERS S. J., WILLIAMS J. y LEVEY M., S. Afr. Lab. Clin. Med. 9 (1963) 277.
- 186.- WOLFSON S. J., BARTCZAK A. y BLOOMER J. R. J. Biol. Chem. 254 (1979) 3543.
- 187.- WHITING M. J. y GRANICK S., J. Biol. Chem. 251 (1976) 1347.
- 188.- SANCOVICH H. A., BATLLE A. M. DEL C. y GRINSTEIN M., Biochim. Biophys. Acta 99 (1965) 580.
- 189.- BLEKKENHORST G. H., EALES L. y PIMSTONE N. R., S. Afr. Med. J., 56 (1979) 918.
- 190.- LOUW M., NEETHLING A. C., PERCY V. A., CARSTENS M. y SHANLEY B. C., Clin. Sci. Mol. Med., 53 (1977) 111.
- 191.- STONARD M. D., Biochem. Pharmacol. 24 (1975) 1959.
- 192.- WAINSTOK DE CALMANOVICI R., MOLINA M. C. R. DE, TAIRA M. C., TOMIO J. M. y SAN MARTIN DE VIALE L. C. Arq. Biol. Tecnol., 24 (1) (1981) 89.
- 193.- PUZYNSKA L., DEBETS F. M. H. y STRIK J. J. T. W. A., Chemical porphyria in man, Elsevier, North Holland, Amsterdam (1979) 161.
- 194.- GRAZIANO M. DEL C., WAINSTOK DE CALMANOVICI R., RIOS DE MOLINA M. DEL C., y SAN MARTIN DE VIALE L. C., 12th Nat. Meet. Argent. Soc. Biochem. Invest. Abstr. 14, 34.
- 195.- RIOS DE MOLINA M. DEL C., WAINSTOK DE CALMANOVICI R., GRAZIANO M. DEL C. y SAN MARTIN DE VIALE L. C., 12th Nat. Meet, Argent, Soc. Biochem. Invest. Abstr. 15, 35.

INDICE.

INTRODUCCION.	
I.- BIOSINTESIS DE HEMO.....	1.
I.1.- Formación de ALA.....	4.
I.1.a.- Mecanismo de acción de ALA-S.....	4.
I.1.b.- Propiedades bioquímicas de ALA-S.....	7.
I.1.c.- Regulación de la actividad de ALA-S.....	10.
I.2.- Biosíntesis de PBG.....	12.
I.3.- Biosíntesis de Uro'gen III.....	14.
I.4.- Transformación de Uro'gen III en Copro'gen III.....	21.
I.5.- Conversión de Copro'gen a Proto.....	25.
I.6.- Conversión de Proto IX a Hemo.....	28.
II.- PORFIRIAS HUMANAS.....	29.
III.- HEXACLOROBENCENO Y SU RELACION CON PORFIRIA.....	31.
III.1.- Contaminación HCB.....	31.
III.2.- Metabolización del HCB.....	31.
III.2.a.- Excreción y acumulación de metabolitos del HCB.....	31.
III.2.b.- Formación de intermediarios reactivos y metabolitos que contienen azufre.....	33.
III.3.- Acción del HCB sobre el camino metabólico del Hemo.....	36.
III.3.a.- Producción de porfiria por HCB.....	36.
III.3.b.- Acción del HCB sobre la actividad de ALA-S.....	38.
III.3.c.- Acción del HCB sobre la actividad de ALA-D, PBG-asa y Copro-D...	38.
III.3.d.- Acción del HCB sobre la actividad de Uro-D.....	39.
IV.- PROPIEDADES DEL PENTAFLOROFENOL.....	41.
IV.1.- Propiedades físicas del PCF.....	41.
IV.2.- Intoxicaciones con PCF.....	42.
IV.3.- Metabolismo del PCF.....	42.
V.- FENOBARBITAL Y SU RELACION CON EL CAMINO METABOLICO DEL HEMO.....	44.
VI.- HIERRO Y SU RELACION CON PORFIRIA.....	45.
VI.1.- Rol del hierro en PCT y su relación con porfiria experimental producida por HCB.....	45.
VI.2.- Rol del hierro en la exacerbación de la PCT.....	47.
VI.2.a.- Efecto del hierro sobre la acumulación de porfirinas y la actividad de ALA-S.....	47.
VI.2.b.- Efecto del hierro sobre la actividad de Uro-CoS.....	48.
VI.2.c.- Efecto del hierro sobre la Uro-D.....	48.
VI.3.- Efecto de la sobrecarga de hierro en porfiria experimental por HCB.	49.
VI.4.- Efecto del HCB en animales con distintos niveles de hierro.....	50.
VI.5.- Deficiencia en hierro por quelantes.....	51.
VI.6.- Deficiencia en hierro por bajos niveles en la dieta.....	51.
OBJETO DEL TRABAJO.....	53.
PARTE EXPERIMENTAL.	

MATERIALES.....	55.
MÉTODOS.....	57.
I. Inducción de porfiria en animales mediante administración de HCB y PCF.	57.
I.1.- En ratas.....	57.
I.2.- En embriones de pollo.....	59.
II.- Extracción y estimación de porfirinas en el hígado de embrión de pollo.....	61.
III.- Extracción y estimación de Porfirinas en hígado, riñón y bazo de ratas.....	62.
IV.- Empleo de resinas Dowex.....	63.
IV.1.- Preparación de los intercambiadores.....	63.
IV.1.a.- Resina aniónica Dowex A.G.1-X ₈ 200-400 mesh.....	63.
IV.1.b.- Resina catiónica Dowex A.G.50-X ₈ 200-400 mesh.....	64.
IV.2.- Determinación de precursores (ALA y PBG) y porfirinas en orina.....	65.
IV.3.- Determinación cuantitativa de ALA y PBG eluidos de las columnas....	67.
IV.4.- Cálculos para determinar ALA, PBG y porfirinas eluidas de las columnas.....	67.
V.- Esterificación de las porfirinas.....	68.
V.1.- Esterificación,.....	68.
V.2.- Pasaje a cloroformo.....	69.
VI.- Identificación de las porfirinas. Cromatografía en papel de los ésteres metílicos de porfirinas.....	69.
VI.1.- Método de Falk y Benson.....	69.
VI.2.- Método de Cornford y Benson.....	70.
VII.- Preparación de Uro III a partir de turacina.....	71.
VIII.- Porfirinógenos.....	72.
VIII.1.- Preparación de amalgama de sodio.....	72.
VIII.2.- Preparación de porfirinógenos.....	73.
IX.- Columnas de Sephadex G-25.....	73.
IX.1.- Preparación.....	73.
IX.2.- Lavado.....	74.
X.- Determinación de hierro total.....	74.
XI.- Determinación de hierro no hémico.....	75.
XII.- Determinación de hierro hémico.....	76.
XIII.- Medición de la actividad de ALA-S en hígado de ratas.....	76.
XIV.- Medición de la actividad de ALA-S en embrión de pollo.....	77.
XV.- Medición de la actividad de ALA-D en hígado de rata.....	78.
XVI.- Medición de la actividad de PBG-asa.....	79.
XVII.- Medición de la actividad de Uro-D.....	80.
XVIII.- Determinación de proteínas.....	81.

RESULTADOS.

I. CONDICIONES EXPERIMENTALES.

1.- Determinación de las condiciones experimentales de distintas enzimas del camino del hemo.....	82.
1.a.- Determinación de las condiciones óptimas de incubación de ALA-D.....	82.
Conclusiones.....	87.
1.b.- Determinación de las condiciones óptimas de incubación de PBG-asa....	87.
Conclusiones.....	94.
2.- Utilización de columnas Dowex 1 y Dowex 50 y sus respectivos rendimientos en las determinaciones de ALA, PBG y porfirinas de orinas de ratas normales y tratadas con HCB.....	97.
2.a.- Coeficiente de extinción para ALA convertido en 2-metil 3-acetil 4-carboxietil pirrol (ALA pirrol).....	97.
2.b.- Estudio de las recuperaciones en las columnas de Dowex 1 y Dowex 50.	99.
3.- Efecto del tratamiento de las ratas con HCB durante períodos cortos....	104.

II.- EXPERIMENTOS PARA ELUCIDAR SI EL HCB PRODUCE PORFIRIA "PER SE" O A TRAVES DE UN METABOLITO.

1.- Efectos del FB, del HCB y de ambos compuestos administrados a ratas Wistar normales.....	108.
1.a.- Condiciones experimentales.....	108.
1.b.- Relación entre el peso del hígado y el peso del cuerpo.....	109.
1.c.- Excreción urinaria de ALA, PBG y porfirinas y naturaleza de las porfirinas.....	111.
1.d.- Porfirinas en hígado. Cantidad acumulada y naturaleza de las mismas.	120.
1.e.- Actividad de ALA-S, ALA-D y Uro-D.....	122.
Conclusiones.....	137.
2.- Efecto del agregado de sobrenadante de homogenato de hígado porfírico por HCB y desproteínizado por calentamiento sobre la actividad de ALA-S de un hígado normal,.....	142.
2.a.- Condiciones experimentales.....	142.
2.b.- Efecto del agregado de sobrenadante de homogenato de hígado porfírico por HCB y desproteínizado por calentamiento sobre la actividad de ALA-S de un hígado normal.....	142.
2.c.- Efecto del agregado de sobrenadante de homogenato de hígado porfírico por HCB y desproteínizado por calentamiento sobre la actividad de ALA-D de un hígado normal.....	145.
2.d.- Efecto del agregado de sobrenadante de homogenato de hígado porfírico por HCB y desproteínizado por calentamiento sobre la actividad de PBG-asa de un hígado normal.....	145.
2.e.- Efecto del agregado de una preparación de hígado porfírico desproteínizado por calor sobre uroporfirinógeno decarboxilasa normal.....	147.
Conclusiones.....	149.
3.- Efecto del agregado de una preparación enzimática de hígado porfírico sin calentar sobre las actividades de distintas enzimas de hígado normal.....	151.
3.a.- Actividad de ALA-S de mezclas de preparaciones de hígados normales y porfíricos.....	151.

3.b.- Actividad de ALA-D de mezclas de preparaciones de hígados normales y porfíricos.....	152.
3.c.- Actividad de PBG-asa de mezclas de preparaciones de hígados normales y porfíricos.....	152.
3.d.- Actividad de Uro-D de mezclas de preparaciones de hígados normales y porfíricos.....	155.
Conclusiones.....	159.
4.- Efecto del agregado de HCB y PCF "in vitro" sobre las actividades de distintas enzimas de hígado normal.....	159.
4.a.- Efecto del agregado de las drogas sobre la actividad de ALA-S.....	160.
4.b.- Efecto del agregado de las drogas sobre la actividad de ALA-D.....	160.
4.c.- Efecto del agregado de las drogas sobre la actividad de PBG-asa.....	162.
4.d.- Efecto del agregado de las drogas sobre la actividad de Uro-D.....	162.
Conclusiones.....	166.
III.- ADMINISTRACION "IN VIVO" DE PCF A RATAS Y A EMBRIONES DE POLLO.	
1.- Obtención de PCF purificado a partir del PCF técnico 60%.....	168.
2.- Dosis y tiempos requeridos para producir intoxicación con PCF técnico y purificado.....	169.
3.- Determinación de distintos parámetros en ratas normales e intoxicadas con PCF técnico y purificado.....	171.
3.a.- Excreción de ALA, PBG y porfirinas en orina de ratas tratadas con PCF técnico y purificado.....	171.
3.b.- Contenido de porfirinas en diversos tejidos de ratas normales e intoxicadas.....	175.
3.c.- Actividad de ALA-S y Uro-D en ratas normales y en ratas tratadas con PCF técnico y purificado.....	176.
4.- Efecto de PCF purificado en hígado de embrión de pollo.....	183.
4.a.- Contenido de porfirinas en hígado de embrión de pollo inyectados con PCF purificado.....	183.
4.b.- Actividad de ALA-S en hígado de embrión de pollo inyectado con PCF purificado.....	183.
Conclusiones.....	185.
IV.- PAPEL DEL HIERRO EN LA PRODUCCION DE PORFIRIA POR HEXACLOROBENCENO.	
1.- Contenido en hierro total, hémico y no hémico en hígado de ratas normales y en intoxicadas con HCB.....	186.
1.a.- Curvas de calibración.....	186.
1.b.- Efecto del HCB sobre el contenido de Fe hepático.....	190.
2.- Efecto de quelantes (α α' biperidilo y 8 hidroxiquinolina) sobre la actividad de distintas enzimas de hígados de ratas normales e intoxicadas con HCB.....	201.
2.a.- Adición de quelantes al medio de incubación de ALA-S.....	201.
2.b.- Adición de quelantes al medio de incubación de ALA-D.....	201.
2.c.- Adición de quelantes al medio de incubación de PBG-asa.....	203.
2.d.- Adición de quelantes al medio de incubación de Uro-D.....	206.

3.- Efecto del agregado de ferritina, hemina y sales de hierro sobre la actividad de distintas enzimas de hígado de ratas normales e intoxicadas con HCB.....	206.
3.a.- Determinación de la cantidad de Fe en la solución de ferritina.....	206.
3.b.- Efecto de ferritina, Fe inorgánico y hemina sobre la actividad de ALA-S normal.....	211.
3.c.- Efecto de ferritina, Fe inorgánico y hemina sobre la actividad de ALA-D normal.....	213.
3.d.- Efecto de ferritina, Fe inorgánico y hemina sobre la actividad de PBG-asa normal.....	213.
3.e.- Efecto del agregado de Fe inorgánico en distintas concentraciones sobre la actividad de ALA-S, ALA-D y PBG-asa.....	216.
3.f.- Efecto de ferritina, Fe inorgánico y hemina sobre la actividad de Uro-D normal.....	216.
Conclusiones.....	222.
DISCUSION- RESUMEN Y CONCLUSIONES.	
Discusión.....	224.
Resumen y conclusiones.....	243.
BIBLIOGRAFIA.....	251.