

Tesis de Posgrado

Estudios sobre la síntesis enzimática de porfobilinógeno a partir del precursor delta aminolevúlico : Aminolevúlico dehidrasa

Bustos, Norma Lidia

1983

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:

Bustos, Norma Lidia. (1983). Estudios sobre la síntesis enzimática de porfobilinógeno a partir del precursor delta aminolevúlico : Aminolevúlico dehidrasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1776_Bustos.pdf

Cita tipo Chicago:

Bustos, Norma Lidia. "Estudios sobre la síntesis enzimática de porfobilinógeno a partir del precursor delta aminolevúlico : Aminolevúlico dehidrasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1983.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1776_Bustos.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**ESTUDIOS SOBRE LA SINTESIS
ENZIMATICA DE PORFOBILINOGENO
A PARTIR DEL PRECURSOR
DELTA AMINOLEVULICO
AMINOLEVULICO – DEHIDRASA**

NORMA LIDIA BUSTOS DE BROWN

ESTUDIOS SOBRE LA SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE
PORFOBILINÓGENO A PARTIR DEL PRECURSOR
 δ -AMINOLEVÚLICO. AMINOLEVÚLICO DEHIDRASA

por

NORMA LIDIA BUSTOS

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS de la
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

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

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas
y Porfirias (CIPYP).

Departamento de Química Biológica. Facultad
de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad
de Buenos Aires.

Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas (CONICET)

1776
Ej 2

a Daniel

a mis padres

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	i
ABREVIATURAS	ii
OBJETIVOS GENERALES	iii
INTRODUCCION	
- CAPITULO I: TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS DERIVADOS	
I.1. Estructura y nomenclatura	1
I.2. Propiedades físicas de los tetrapirroles	8
I.3. Distribución del hemo	12
I.4. Clorofila. Distribución	18
I.5. Porfirinas	20
I.6. Vitamina B ₁₂	21
Referencias	24
- CAPITULO II: BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES	
II.1. Estudios isotópicos	26
II.2. Enzimas del camino de los tetrapirroles	28
II.3. Catabolismo del hemo	53
Referencias	57
- CAPITULO III: ALA-DEHIDRASA	
III.1. Función del ALA-D en el camino biosintético del hemo	66
III.2. Historia	67
III.3. Estructura y peso molecular	68
III.4. Mecanismo de acción	69
III.5. Activación e inhibición del ALA-D	73
III.6. Inhibición	80
III.7. Significado biológico y bioquímico	89
III.8. Importancia clínica	97
III.9. Factores ambientales: metales	106
Referencias	109

- CAPITULO IV: INTOXICACION POR PLOMO	
IV.1.	Introducción 116
IV.2.	Vías de intoxicación por plomo 117
IV.3.	Fuentes de intoxicación 117
IV.4.	Criterios clínicos 119
IV.5.	Criterios de laboratorio 123
IV.6.	Metabolismo del plomo en el hombre 124
IV.7.	El cólico saturnino 127
IV.8.	Procedimientos médicos específicos 128
IV.9.	Disturbios en el metabolismo del hemo 129
IV.10.	Tratamiento de la intoxicación por plomo 133
	Referencias 135
- CAPITULO V: FANTASMAS DE ERITROCITOS	
V.1.	Generalidades 137
V.2.	Propiedades 138
V.3.	Preparación de los fantasmas de eritrocitos 142
V.4.	Incorporación de macromoléculas en fantasmas de eritrocitos 145
V.5.	Metabolismo energético en eritrocitos y fantasmas de eritrocitos 147
V.6.	Características de la supervivencia de los eritrocitos cargados 149
V.7.	Aplicaciones de enzimas atrapadas en eritrocitos 151
V.8.	Terapia por reemplazo enzimático 153
	Referencias 157
MATERIALES Y METODOS	
M.I.	Reactivos 160
M.II.	Purificación de enzimas 160
M.III.	Experiencias con fantasmas 162
M.IV.	Determinación de hemoglobina 163
M.V.	Sistemas de incubación y determinación de la actividad enzimática 164
M.VI.	Determinación de la concentración proteica 167
M.VII.	Preparación de los hemolizados 167
M.VIII.	Derivados oxidados de Sephadex 168
M.IX.	Preparación de fantasmas de eritrocitos 171
M.X.	Efecto <i>in vitro</i> del agregado de fantasmas de eritrocitos cargados con enzima, a glóbulos rojos de intoxicados con plomo 172

M.XI.	Preparación de fantasmas de eritrocitos autólogos humanos cargados con ALA-D	172
	Referencias	173

RESULTADOS Y DISCUSION

- PARTE I:	ESTUDIOS SOBRE EL ALA-D DE ERITROCITOS HUMANOS	174
I.1.	Actividad del ALA-D en distintos preparados de glóbulos rojos	175
I.2.	Aislamiento, purificación y peso molecular	176
I.3.	Propiedades	179
I.4.	Conclusiones	194
- PARTE II:	TERAPIA ENZIMATICA	197
	PARTE II A: DESARROLLO DEL TRANSPORTADOR	198
II.A.1.	Derivados oxidados de Sephadex	198
II.A.2.	Fantasmas de eritrocitos	209
	PARTE II B: USO DE LOS FANTASMAS DE ERITROCITOS EN EL TRATAMIENTO DE LA INTOXICACION POR PLOMO	221
II.B.1.	Estudios <i>in vitro</i>	221
II.B.2.	Estudios <i>in vivo</i>	224
	PARTE II C: CONCLUSIONES FINALES	248
	Referencias	250

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi sincero agradecimiento a la Dra. Alcira M. del C. Batlle de Albertoni, quien permanentemente me dirigió, orientó y estimuló en la realización de este trabajo.

Agradezco también a las Dras. Ana María Stella y Eva Wider por el apoyo que tantas veces me brindaron.

A la Lic. Elba Vázquez que en todo momento me ayudó, de dicándome muchas horas de su tiempo.

Al Lic. Luis Espínola quien me orientó en las técnicas de experimentación animal.

Al Lic. Roberto Pagano por su eficiente colaboración en la realización de algunas de las experiencias y corrección de los originales.

A la Lic. Ana María Buzaleh por el esmero y dedicación puestos al transcribir el manuscrito.

Al CONICET, la SUBCYT, la Secretaría de Salud Pública del Ministerio de Bienestar Social y el Banco de la Nación Argentina por los subsidios con que apoyaron la realización de este trabajo.

Al CONICET por las becas que me otorgó.

Al Dr. R. Meléndez del Centro Panamericano de Zoonosis, al Dr. J. Castro de CITEFA y al Dr. M. Copello del Instituto de Farmacología de Buenos Aires por la provisión de todos los anima les de experimentación.

Al Servicio de Hematología del Hospital Ramos Mejía por suministrarme gentilmente la fuente enzimática.

A la Dra. H. Conti del Departamento de Clínica Médica del Hospital Ramos Mejía por el control clínico del paciente.

Al Dr. E. Gobbi del Laboratorio Químico de la Policía Fe deral, por las determinaciones de plomo.

A los Dres. Héctor N. Torres y Luis F. Leloir del Instituto de Investigaciones Bioquímicas Campomar por haber facilita do las cámaras estériles.

Y muy especialmente a todos mis compañeros del CIPYP, que con su cariño y amistad hicieron felices estos años de tra bajo.

ABREVIATURAS

Succ.CoA	Succinil CoA
DOVA	γ - δ -dioxoalerato
ALA	Acido δ -aminolevúlico
PBG	Porfobilinógeno
URO	Uroporfirina
URO-gen	Uroporfirinógeno
COPRO	Coproporfirina
CPG ó COPRO-gen	Coproporfirinógeno
PP-PROTO	Protoporfirina
PROTO-gen	Protoporfirinógeno
Succ.CoA-S	Succinil-CoA-Sintetasa
DOVA-T	DOVA-Transaminasa
ALA-S	ALA-Sintetasa
ALA-D	ALA-Dehidrasa
PBG-asa	Porfobilinogenasa
CPG-asa	Coprogenasa
PCT	Porfiria Cutánea Tardía
PAI	Porfiria Aguda Intermitente
GSH	Glutati6n
CiSH	Cisteína
PCMB	p-Cloromercuribenzoato
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético
SDS	Dodecil sulfato de sodio
AIA	β -alil-isopropil-acetamida
DDC	3,5-dicarbetoxi-dihidrocolidina
TCA	Acido tricloroacético
GR	Gl6bulos rojos
Km	Constante de Michaelis-Menten
Hb	Hemoglobina
dil	Diluci6n
FGR	Fantasmas de gl6bulos rojos
FGRn(ALA-D)	Fantasmas de gl6bulos rojos normales cargados con ALA-D
FGRi(ALA-D)	Fantasmas de gl6bulos rojos intoxicados cargados con ALA-D

OBJETIVOS GENERALES

Todas las células vivas emplean el mismo camino biosintético para formar hemo y clorofila, hasta la etapa de Protoporfirina IX. En base a los estudios de los últimos 40 años, se posee hoy abundante información acerca de esta secuencia metabólica, tanto en cuanto a sus metabolitos como a las enzimas involucradas.

Nos interesa, en este caso, la δ -Aminolevúlico Dehidrasa (ALA-D), que cataliza la conversión de dos moléculas del precursor δ -Aminolevúlico (ALA) en el primer y único precursor aromático, el monopirrol Porfobilinógeno (PBG).

Existen evidencias de que en varios organismos el ALA-D juega un papel fundamental en el mecanismo de control de la síntesis de los tetrapirroles. Se ha demostrado que en pacientes con saturnismo, la actividad de esta enzima está disminuída, considerándose como un índice del grado de intoxicación por plomo. Otros metales también inhiben o aún activan el ALA-D, de manera que a menudo resulta compleja la interpretación de los efectos de ciertos iones inorgánicos sobre el ALA-D. De allí que resulta interesante reinvestigar, no sólo la acción del plomo sobre esta enzima sino también la de otros iones que normalmente están presentes en la sangre.

Si bien la enzima de sangre se ha purificado parcialmente, la mayoría de los datos relacionados con los efectos del plomo y otros metales pesados se han realizado con glóbulos rojos enteros o hemolizados o aún con sangre total. Por ello se consideró de interés llevar a cabo un estudio comparativo con preparados crudos y parcial o altamente purificados de la enzima.

Se intentó desarrollar entonces un nuevo método para la purificación de la enzima de eritrocitos. Una de las mayores dificultades al trabajar con sangre es precisamente la separación de las enzimas de la hemoglobina. Se planeó ensayar un tratamiento distinto, con solventes orgánicos, con el cual se esperaba desnaturalizar selectiva y totalmente a la hemoglobina. Las etapas siguientes dependerían de los resultados de la primera.

Por otro lado, teniendo en cuenta que la actividad de esta enzima se encuentra significativamente reducida en ciertas porfirias, secundarias o aún hereditarias, se planteó la posibilidad

dad de compensar esta deficiencia o bloqueo enzimático mediante la administración exógena de la enzima.

Sabiendo que la terapia por reemplazo directo con la enzima está asociada a una serie de dificultades, las etapas iniciales consistieron en encontrar un carrier no tóxico y biodegradable de la enzima, que permitiera transportarla al tejido en el cual ocurría la falla y una vez allí facilitara su toma por las células enfermas para poder actuar libremente.

Se planearon entonces estudios tendientes a la búsqueda y desarrollo de una preparación de ALA-D de eritrocitos insolubilizada que tuviera las propiedades mencionadas.

En primer lugar se pensó en un transportador que permitiera una lenta solubilización del mismo, una vez introducido en el organismo, con liberación simultánea de la enzima activa unida a fragmentos del soporte, proyectándose así una serie de experiencias utilizando derivados oxidados de Sephadex como matriz, a los cuales se les uniría el ALA-D purificada.

Además del carrier anterior, se planeó ensayar con los mismos fines, el uso de eritrocitos. Los eritrocitos poseen muchas de las características de un carrier ideal. Para su preparación puede emplearse sangre del mismo animal o paciente. Considerando que los eritrocitos pueden circular casi tanto tiempo como los glóbulos rojos normales, durante todo ese tiempo la enzima encapsulada puede actuar en la sangre circulante y cuando el eritrocito es degradado por el sistema retículo endotelial, la sustancia atrapada se trasladará a los lisosomas de las células fagocíticas.

Teniendo en cuenta que en las intoxicaciones por plomo el ALA-D está significativamente disminuída, el objetivo final era la aplicación de la terapia por reemplazo enzimático, para lo cual se llevarían a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* con animales intoxicados, luego de determinar las condiciones para el encapsulamiento de la enzima purificada en los fantasmas de eritrocitos.

INTRODUCCION

CAPITULO I

TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS DERIVADOS

I.1. Estructura y Nomenclatura	1
I.1.1. Porfirinas	2
I.1.2. Metaloporfirinas	4
I.1.3. Complejos de Hemo y Hematina	5
I.1.4. Clorofilas	6
I.1.5. Tetrapirroles de cadena abierta	8
I.2. Propiedades físicas de los tetrapirroles	8
I.2.1. Solubilidad	8
I.2.2. Espectros de absorción	10
I.2.3. Fluorescencia	11
I.3. Distribución del Hemo	12
I.3.1. Generalidades	12
I.3.2. Hemoglobina	12
I.3.3. Mioglobina	13
I.3.4. Citocromos	14
I.3.5. Peroxidasas	15
I.3.6. Catalasas	16
I.3.7. Triptofano pirrolasa	17
I.4. Clorofila. Distribución	18
I.4.1. Clorofila de plantas	18
I.4.2. Clorofila de bacterias fotosintéticas	19
I.5. Porfirinas	20
I.5.1. Porfirinas en animales	20
I.5.2. Acumulación de porfirinas en organismos no fotosintéticos	20
I.5.3. Acumulación de porfirinas por bacterias fotosintéticas	21
I.6. Vitamina B ₁₂	21
Referencias	24

I. TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS DERIVADOS

I.1. Estructura y Nomenclatura

Los tetrapirroles son derivados de la porfina (Figura I.1.) que contiene cuatro anillos pirrólicos (A, B, C y D) unidos entre sí a través de cuatro puentes metenos (α , β , γ y δ).

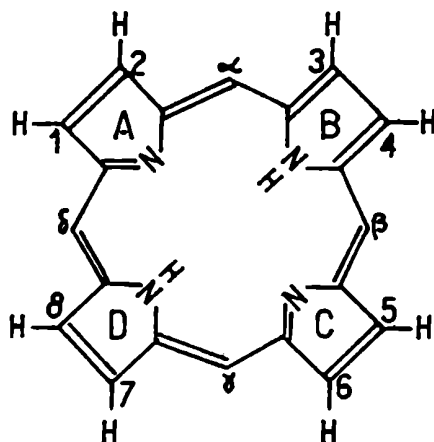


FIGURA I.1.: Porfina

La existencia de dobles enlaces alternados en los 16 átomos de carbono internos del anillo da lugar a una estructura resonante altamente resistente a modificaciones químicas. Esta molécula resonante tiene una estructura plana, con todos los átomos en el mismo plano.

Las estructuras de los distintos tetrapirroles encontrados en la naturaleza derivan de la porfina según varias modificaciones:

- 1) Por sustitución de los átomos de carbono externos (numerados del 1 al 8) de los anillos pirrólicos; el sustituyente puede ser un grupo alquilo, o un átomo de H y un grupo alquilo como en las clorofilas.
- 2) Por inserción de un metal para formar un complejo; tales complejos metálicos pueden luego modificarse por cambios de valencia, por formación de compuestos de coordinación y por combinación con proteínas específicas.

3) Por sustitución o reemplazo de los carbonos de los puentes meteno. Los sustituyentes pueden ser átomos de H como en los porfirinógenos, o un anillo ciclopentanona como en las clorofilas. El anillo corrina, típico de los derivados de la vitamina B₁₂, ha perdido el carbono del puente meteno δ .

Una modificación de la estructura básica de la porfina de especial importancia involucra la reducción de los carbonos de los puentes meteno a metileno. Esta adición de hidrógenos destruye la resonancia del anillo de 16 miembros. Los compuestos reducidos, llamados porfirinógenos, no presentan la característica de absorción en el visible que tienen las porfirinas. Los porfirinógenos no son moléculas planas, y son muy inestables a la oxidación por el aire (Figura I.2.).

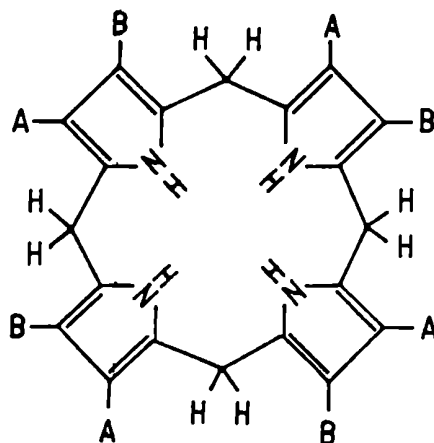


FIGURA I.2.: Representación esquemática de la estructura de un porfirinógeno tipo I.

I.1.1. Porfirinas

Las porfirinas son tetrapirroles libres de metales que se diferencian estructuralmente por la naturaleza y el ordenamiento de las cadenas laterales en posición β de los anillos pirrólicos. Por ejemplo, la uroporfirina tiene cuatro restos acético y cuatro restos propiónico (Figura I.3.). Como existen cuatro ordenamientos posibles de los restos acético y propiónico en el núcleo tetrapirrólico, existen cuatro isómeros de po

sición de la Uroporfirina (Tipo I, II, III y IV).

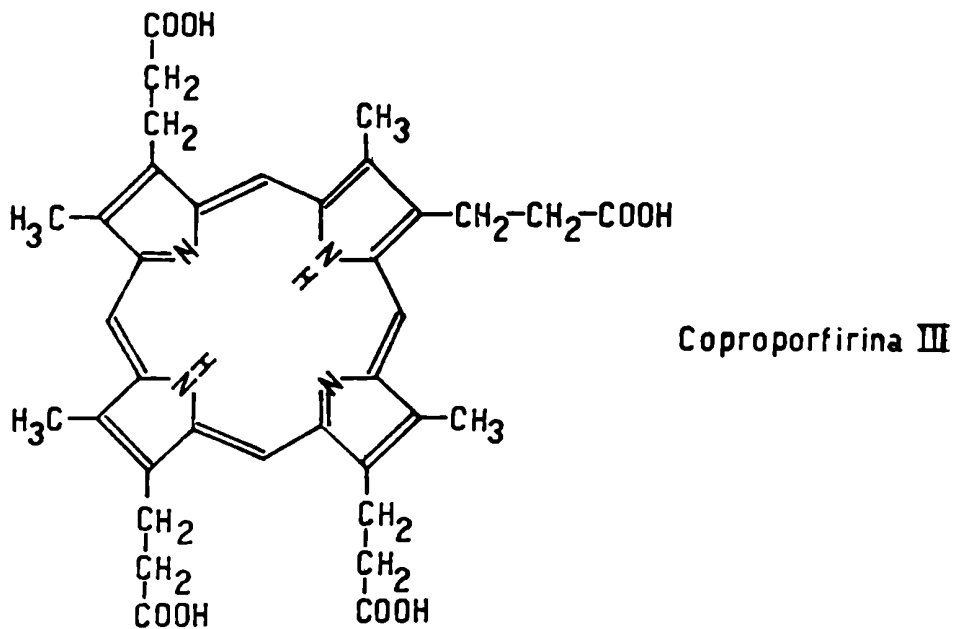
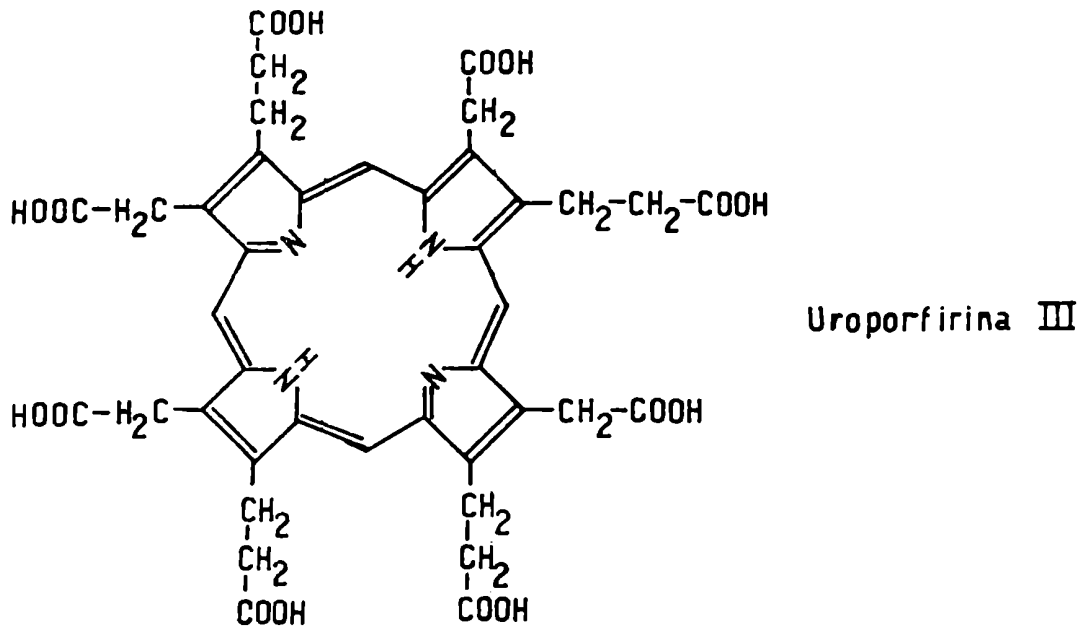


FIGURA I.3.: Estructuras de la Uro y Co proporfirina III.

Para la protoporfirina, que posee restos metilo, vinilo y propiónico, existen 15 isómeros posibles, pero sólo uno, la Protoporfirina IX, es el isómero natural (Figura I.4.).

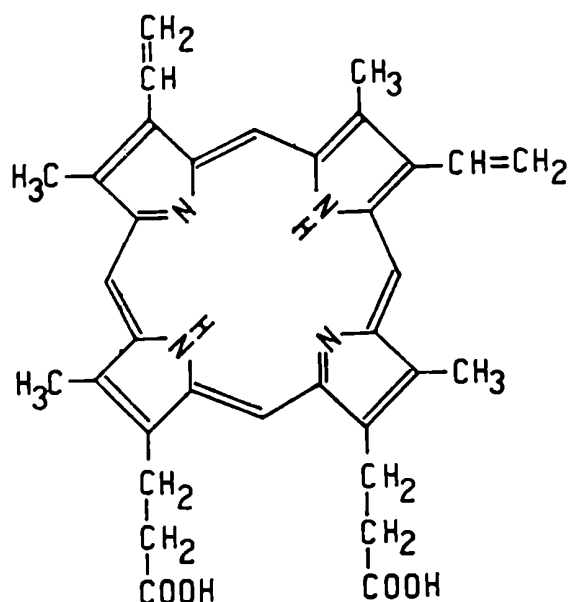


FIGURA I.4.: Protoporfirina IX.

La naturaleza seleccionó sólo una de las series isoméricas, la III, ya que todos los tetrapirroles fisiológicamente activos tienen la misma configuración que la uroporfirina III y la protoporfirina IX.

Los isómeros tipo I de la uro y la coproporfirina fueron aislados de fuentes naturales, pero no parecen tener ningún rol fisiológico y son el resultado de un desorden en el metabolismo de los tetrapirroles o de reacciones químicas no enzimáticas de los precursores. En cuanto a derivados tipo II y IV, son solamente productos de síntesis química.

Las porfirinas se reducen a porfirinógenos incoloros por tratamiento con amalgama de sodio; éstos son los verdaderos intermediarios en la biosíntesis de los tetrapirroles. Se oxidan espontáneamente a porfirinas, y esta reoxidación puede acelerarse por el agregado de agentes oxidantes suaves, como el yodo.

I.1.2. Metaloporfirinas

Las porfirinas se combinan fácilmente con varios metales para formar quelatos, de ellos sólo los de hierro, magnesio y cobalto tienen roles biológicos importantes.

Existen en la naturaleza complejos de uro- y coproporfirina con cobre, zinc y magnesio, por ejemplo en la orina; pero éstos probablemente se formen espontáneamente, ya que las porfirinas tienden a formar quelatos con mucha facilidad, en especial bajo condiciones alcalinas suaves. Tanto las porfirinas libres como sus ésteres se combinan con los metales, formando complejos solubles en solventes orgánicos. Estas propiedades muestran que los metales forman complejos de coordinación más que sales.

Los complejos de hierro se conocen con el nombre de hemos, especificándose la naturaleza de la porfirina con un prefijo adecuado (por ejemplo: mesohemo). El más conocido es el protohemo o hierro-protoporfirina, en el cual el hierro puede estar en estado ferroso o férrico. En la práctica, se utilizan los términos hemo y hematina para referirse al protohemo ferroso y férrico, respectivamente.

El hemo, grupo prostético de la hemoglobina, se oxida rápidamente, en contacto con aire, a hematina o hemina (cloruro de protoporfirina férrica) si hay presente iones cloruro. Este cloruro, que es estable y es la forma usual en la cual se aísla el grupo prostético de la hemoglobina, es el más utilizado en estudios bioquímicos.

I.1.3. Complejos de Hemo y Hematina

El hemo (Figura I.5.) tiene una estructura planar, en la cual la protoporfirina y el hierro están ubicados en el mismo plano. El metal puede unirse por coordinación con dos iones, ubicados arriba y abajo del plano del anillo de porfirina; estos derivados se conocen como hemocromos o hemocromógenos. Entre las sustancias que pueden formarlos se encuentran el peróxido de hidrógeno, monóxido de carbono, oxígeno, iones cianuro y bases nitrogenadas como la piridina y el amonio.

El hemo también se combina con proteínas desnaturalizadas en las cuales los grupos formadores de hemocromo, como el anillo imidazol de la histidina, son accesibles.

La hematina también forma compuestos similares llamados hemicromos. En los hemicromos el hierro está en estado férrico; en los hemocromos, en estado ferroso.

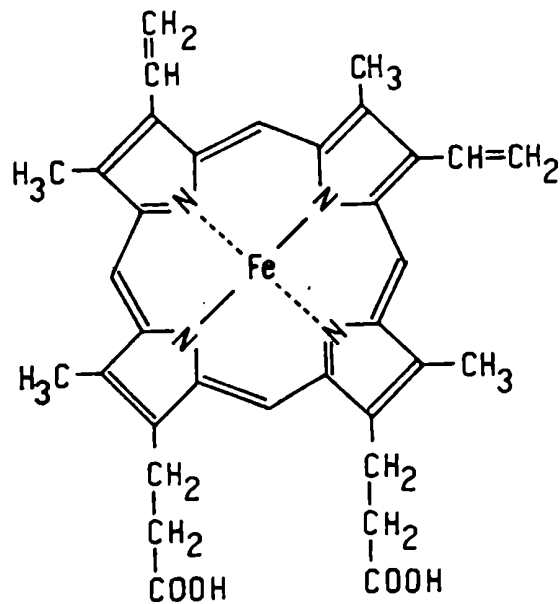


FIGURA I.5.: Hemo

Las proteínas que tienen una hierro-porfirina como grupo prostético reciben el nombre de hemoproteínas. Este es un término convencional y no implica que el hierro esté en estado ferroso ni que sea particularmente protohemo. Las proteínas específicas se unen al hierro por coordinación a través de grupos funcionales convenientes, provenientes de residuos aminoácido; además pueden formarse uniones adicionales entre residuos aminoácido y las cadenas laterales del anillo porfirina.

La facilidad con la cual la mitad porfirínica se separa de la proteína varía entre las hemoproteínas, dependiendo de la presencia y naturaleza de las uniones covalentes. En ausencia de tales uniones, los solventes orgánicos suelen ser efectivos. Para romper uniones covalentes es necesaria la hidrólisis con ácidos o álcalis.

1.1.4. Clorofilas

Las clorofilas difieren en su estructura de los hemos en cuatro aspectos importantes (Figura 1.6.):

1) Son complejos de magnesio

- 2) Tienen el anillo D (en clorofilas vegetales) y los anillos D y B (en bacterioclorofilas) totalmente reducidos.
- 3) Tienen un anillo ciclopentanona adicional (E), formado por ciclación de la cadena lateral ácido propiónico en C-6 con el meteno γ .
- 4) La cadena lateral propiónica en C-7 está esterificada con un alcohol isoprenoide de cadena larga, generalmente fitol.

En la naturaleza existen diferentes tipos de clorofilas, las más conocidas son la *a*, la *b* y la bacterioclorofila. Las clorofilas difieren entre sí en los sustituyentes de los carbonos externos de los anillos pirrólicos.

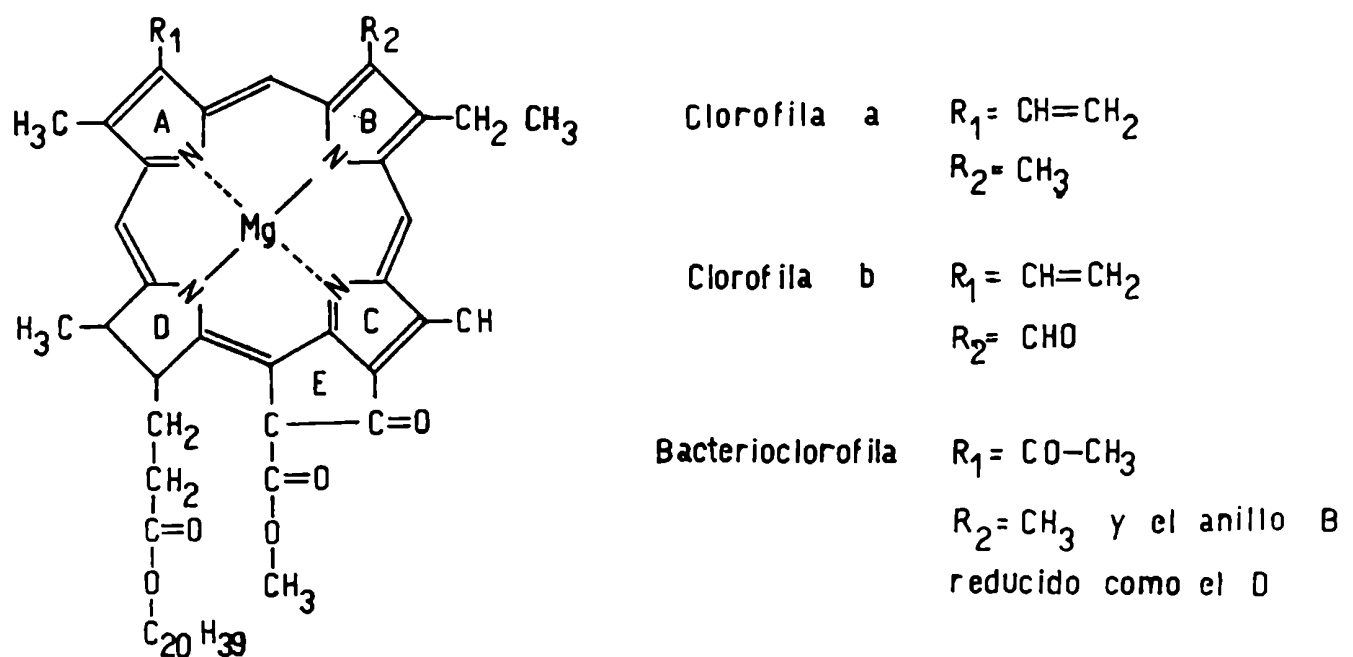


FIGURA I.6.: Estructura de las clorofilas

La nomenclatura de los derivados de las clorofilas se basa en la presencia o ausencia del magnesio y del fitol. Los correspondientes derivados de la bacterioclorofila llevan el prefijo "bacterio".

Todas las clorofilas *in vivo* están unidas a complejos lipoproteicos pero aún se desconoce la naturaleza de la unión. Como pueden extraerse fácilmente con solventes orgánicos, no se cree que existan uniones covalentes fuertes.

I.1.5. Tetrapirroles de cadena abierta

Estos compuestos muy coloreados se encuentran en la naturaleza principalmente como pigmentos biliares y como el grupo prostético de las ficobilinas de las algas rojas y azul-verdes.

Existe una gran variedad de pigmentos biliares, que difieren en el grado de hidrogenación de los átomos de C que unen los anillos pirrólicos. Como los compuestos de cadena abierta han perdido la estructura resonante del núcleo porfirina, son inestables y fácilmente oxidables. El tipo y la distribución de las cadenas laterales alifáticas son similares a los de las porfirinas, excepto que poseen algunos restos etilo en lugar de vinilos.

En el caso de los pigmentos biliares, el primer paso en el proceso degradativo del hemo es la oxidación del carbono del puente metilénico α por acción de una α -metenil oxidasa, con liberación de monóxido de carbono. El producto de esta oxidación se convierte rápidamente en el tetrapirrol de cadena abierta conocido como biliverdina IX α (Figura I.7.), que luego sufre una reducción enzimática a bilirrubina IX α . La bilirrubina es transportada al hígado donde se convierte en un diglucurónico soluble en agua, de manera que se excreta en el duodeno por la bilis.

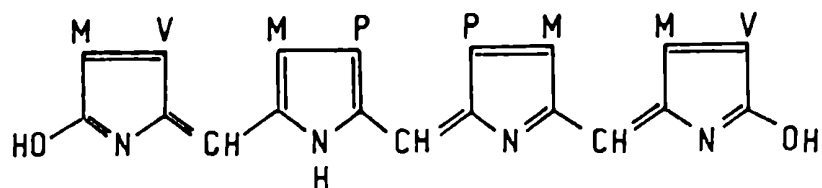
Las ficobilinas de las algas rojas y azul-verdes son cromoproteínas solubles en agua, en las cuales el grupo prostético es el pigmento biliar. Hay, por lo menos, dos tipos de ficobilinas, la ficocianina (azul) y la ficoeritrina (roja). Las estructuras más probables son las que se ilustran en la Figura I.8.

I.2. Propiedades físicas de los tetrapirroles

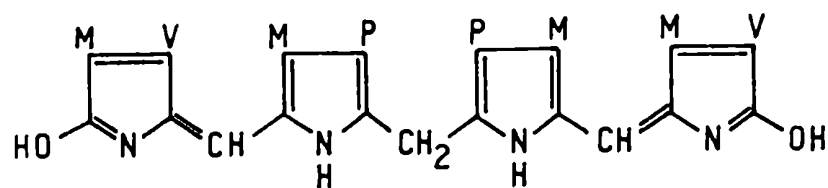
I.2.1. Solubilidad

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

portadores de grupos hidrofílicos, alcohólicos y carboxílicos.



Biliverdina IX α



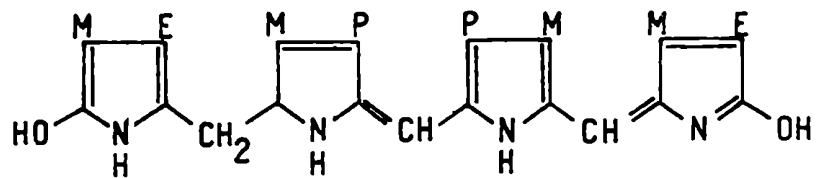
Bilirrubina IX α

FIGURA 1.7.: Estructuras de la Biliverdina IX α y de la Bilirrubina IX α
M: $-\text{CH}_3$; V: $-\text{CH}=\text{CH}_2$
P: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

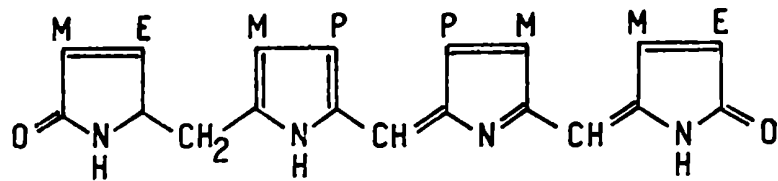
Los solventes orgánicos más comúnmente empleados para la extracción de tetrapirroles son éter y dioxano, aunque las clorofilas, en virtud de la presencia del resto fitol, también son solubles en éter de petróleo.

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

La solubilidad de los tetrapirroles en ácidos y álcalis diluidos depende del número de ácidos carboxílicos libres; así vemos que la Uroporfirina, con 8 restos carboxilo, es la más soluble, en tanto que la Protoporfirina, con 2 restos carboxilo, es la menos soluble.



Ficocianobilina



Ficoeritrobilina

FIGURA I.8.: Estructuras probables de la Ficocianobilina y de la Ficoeritrobilina
M: $-\text{CH}_3$; E: $-\text{CH}_2\text{CH}_3$; P: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

I.2.2. Espectros de absorción

Las porfirinas presentan fuertes y características bandas de absorción en las regiones visible y ultravioleta cercano del espectro, debido a la presencia de un sistema de dobles ligaduras conjugadas en el núcleo porfirínico. El espectro de absorción de los tetrapirroles es de fundamental importancia para su identificación y estimación cuantitativa. Todas las porfirinas exhiben un máximo de absorción en la región entre los 350 y 450 nm, conocida como banda de Soret, que es la que se emplea generalmente para la cuantificación de estos pigmentos. El número

ro y patrón de bandas que se puede observar en la zona del visible, varía con el tipo de tetrapirroles, con el solvente y con el pH, pero es absolutamente característico para cada uno de ellos, en un solvente y pH determinados.

En soluciones ácidas, la banda de Soret es mucho más intensa.

Los complejos de porfirinas con metales divalentes exhiben un espectro visible de dos bandas con un máximo muy agudo entre 550 y 560 nm; lo mismo sucede con los hemocromos.

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

Los tetrapirroles de cadena abierta presentan espectros característicos en la región del visible, con una absorción máxima entre 400 y 650 nm, según el compuesto, pero no poseen la banda de Soret, característica de los ciclotetrapirroles.

1.2.3. Fluorescencia

Una propiedad típica de las porfirinas libres y sus ésteres es la intensa fluorescencia roja emitida por radiación con luz ultravioleta de longitud de onda alrededor de 400 nm. Esta propiedad permite detectar porfirinas presentes en cantidades del orden de 10^{-8} M. La intensidad de la fluorescencia depende del solvente y del pH, es mínima en el punto isoeléctrico y máxima en ácidos minerales, como el HCl a pH 1,0.

Las metaloporfirinas, salvo pocas excepciones, no fluorescen, o lo hacen con intensidades mucho menores que las porfirinas libres.

Los porfirinógenos son incoloros y no fluorescen.

I.3. Distribución del hemo

I.3.1. Generalidades

El término hemoproteína se usa para denominar aquellas proteínas que contienen como grupo prostético un quelato tetrapirrólico de hierro. El protohemo o derivados muy relacionados actúan como grupo prostético de la hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalasa, algunas peroxidasas y triptofano pirrolasa. En muchas hemoproteínas, el protohemo se une a la proteína específica por coordinación entre el átomo de hierro y átomos de nitrógeno de cadenas laterales básicas de la proteína. Estas uniones se rompen en forma relativamente fácil, por ejemplo, por tratamiento de la hemoproteína con acetona a pH 2. En otras hemoproteínas como el citocromo c, existen uniones covalentes adicionales entre las cadenas laterales de la porfirina y los residuos aminoácido. En este caso se requieren tratamientos más drásticos para separar la mitad hémica de la hemoproteína (Marks, 1969).

I.3.2. Hemoglobina

La hemoglobina es un componente de los glóbulos rojos, responsable del transporte de oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, a través de las arterias, arteriolas y capilares. Participa también en el transporte del CO₂ desde los tejidos hasta los pulmones.

El rol de la hemoglobina como transportadora de oxígeno es vital, lo cual se evidencia si consideramos que en su presencia, un litro de sangre arterial puede disolver y transportar 210 ml de oxígeno a temperatura corporal, mientras que en su ausencia, esa capacidad se reduce a apenas 3 ml (Marks, 1969).

La hemoglobina de mamíferos tiene un peso molecular de 64.000 y contiene 4 moles de hemo por mol de globina. Cada uno de los 4 átomos de hierro de la hemoglobina puede tomar un mol de oxígeno; en esta forma, la molécula se conoce como oxihemoglobina. En ambas formas, con oxígeno o libre de él, el hierro se encuentra al estado ferroso. Si el átomo de hierro de la hemoglobina se oxida a la forma férrica, el compuesto resultante,

llamado metahemoglobina, es incapaz de transportar oxígeno.

La globina está constituida por 4 cadenas polipeptídicas que consisten en dos pares idénticos $\alpha_2 \beta_2$. Cada grupo protohemo se une a una de ellas.

También en la linfa de muchos invertebrados se encuentran hemoproteínas que transportan oxígeno. Mientras que la mayoría de estas hemoproteínas contienen protohemo como grupo prostético, la parte proteica es generalmente mucho mayor que la globina y se han encontrado pesos moleculares tan altos como 3 millones. La hemoglobina ha sido identificada en leguminosas (leghemoglobina), en las cuales su presencia está confinada a las células de los nódulos que contienen la bacteria simbiótica de la especie *Rhizobium*, relacionada con la fijación de nitrógeno (Lascelles, 1964).

I.3.3. Mioglobina

La mioglobina es una hemoproteína semejante a la hemoglobina en su capacidad para unirse reversiblemente al oxígeno. Está presente en el músculo de todos los vertebrados e invertebrados; en el hombre se encuentra predominantemente en el músculo cardíaco, en un contenido de 34,7 g para un peso de 70 kg, el cual es considerablemente menor que el de hemoglobina, que alcanza hasta 912,8 g (Drabkin, 1951).

La mioglobina tiene mayor afinidad por el oxígeno que la hemoglobina y es capaz de aceptar oxígeno de la hemoglobina y almacenarlo en las células musculares. Cuando el aporte de oxígeno se hace limitante, la mioglobina le cede oxígeno a la citocromo oxidasa, que a su vez tiene mayor afinidad por el oxígeno que la mioglobina. El alto contenido de mioglobina en el músculo de los animales que nadan se cree que facilita su inmersión por largos períodos.

La estructura de la mioglobina (PM 17.000) es más simple que la de la hemoglobina. Consiste en una sola cadena polipeptídica y tiene un grupo protohemo. El átomo de hierro del hemo está unido a un residuo histidina. El grupo protohemo está ubicado en una región rica en aminoácidos aromáticos, rodeado por sus cadenas laterales hidrofóbicas. Los grupos propiónico polares se encuentran en la parte externa de la cadena, mien-

tras que los grupos vinilo no polares están sumergidos en la región interna no polar de la molécula (Marks, 1969).

I.3.4. Citocromos

Los citocromos se definen como hemoproteínas cuya principal función biológica es el transporte de electrones y/o hidrógeno en virtud de un cambio reversible de valencia de su hierro hémico (Keilin, 1930).

Los citocromos se clasifican en a, b, c y d, de acuerdo a la naturaleza y modo de unión de sus mitades hémicas a la proteína. Los citocromos se identifican individualmente con subíndices luego de la letra de clase, por ejemplo "citocromo b₂".

Citocromo a: El grupo prostético hemo contiene una cadena lateral formilo.

Citocromo b: Contienen protohemo como grupo prostético.

Citocromo c: Citocromos con uniones covalentes entre las cadenas laterales del hemo y la proteína. Este grupo incluye todos los citocromos con grupos prostéticos unidos de esta manera.

Citocromo d: Citocromos con hierro-dihidroporfirina (clorina) como grupo prostético.

Aunque la contribución cuantitativa de citocromos al contenido total de tetrapirroles en los organismos que contienen hemoglobina o clorofila es pequeño, juegan un rol vital en el funcionamiento de estos organismos (Lascelles, 1964; Drabkin, 1951). En las células animales, los citocromos están localizados en las mitocondrias, donde, junto con la ubiquinona, flavin adenin dinucleótido (FAD) y nicotinamida adenin dinucleótido (NAD), constituyen un sistema de transporte de electrones altamente organizado.

NAD → FAD → ubiquinona → citocromo b → citocromo c₁ → citocromo c → citocromo a(a₃) → O₂

Si bien al comienzo de estos estudios se creía que los citocromos estaban asociados exclusivamente con el transporte de electrones al oxígeno, se encontraron citocromos funcionalmen

te activos en algunas bacterias estrictamente anaeróbicas. Así, en *Desulfovibrio desulfuricans*, anaeróbica obligada, hay evidencias de que los citocromos están involucrados en el transporte de electrones para la reducción del sulfato (el aceptor terminal de electrones) a sulfuro (Postgate, 1959). De igual modo, se ha demostrado que los citocromos están involucrados en el transporte de electrones en organismos que usan nitrato como aceptor terminal de electrones (Newton y Kamen, 1961). Se encontraron citocromos en cloroplastos de hojas (Lascelles, 1964) y en cromatóforos de bacterias fotosintéticas (Vernon y Kamen, 1954), donde se cree que están vinculados al transporte de electrones asociado con la fotosíntesis (Rabinowitch y Govindjee, 1965).

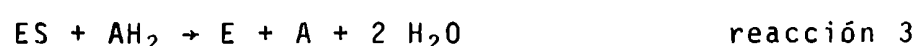
I.3.5. Peroxidasas

Las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de distintos compuestos orgánicos por peróxido de hidrógeno (reacción 1):



donde AH_2 , el dador de hidrógenos, puede ser un fenol, una amina primaria, secundaria o terciaria, ácido ascórbico o un indol. Además, ciertos iones inorgánicos, particularmente el ion yoduro, son oxidados por peroxidasas.

El mecanismo de acción de la peroxidasa ha sido muy estudiado (Dixon y Webb, 1964). Una de las razones es el hecho de que se forma un complejo enzima-sustrato (ES) entre la peroxidasa (E) y el peróxido de hidrógeno (S) aún en ausencia del donador de hidrógenos (AH_2). Además, cuando el complejo se combina con el H_2O_2 cambia el espectro de absorción, de manera que la concentración del complejo peroxidasa-peróxido se puede seguir fácilmente por espectrofotometría. La reacción total implicaría dos etapas:



Las peroxidasas parecen llevar a cabo funciones biológicas diferentes, si bien este aspecto es objeto de estudio.

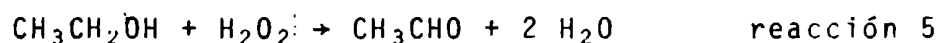
Las peroxidasas pueden dividirse en dos clases, de acuerdo con la naturaleza de su grupo prostético: las peroxidasas-flavoproteínas y las que contienen hierro. Estas últimas pueden subdividirse en dos grupos: las que contienen protohematina como grupo prostético y las que contienen un quelato de hierro de un tetrapirrol aún no identificado (Marks, 1969).

1.3.6. Catalasas

Las catalasas son enzimas que catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno, de acuerdo con la siguiente ecuación:



En algunos casos pueden actuar como peroxidasas. Así, cuando se agrega catalasa y etanol a un sistema que produce H_2O_2 , el alcohol se oxida a acetaldehído (Keilin y Hartree, 1945).



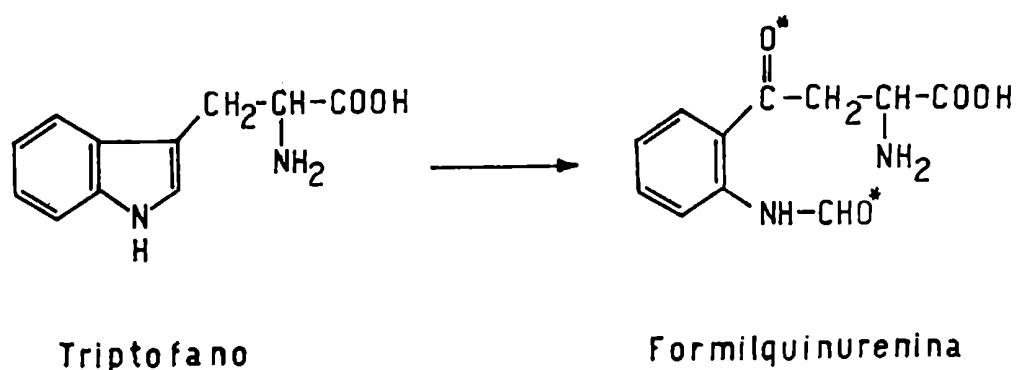
El mecanismo de acción general de las catalasas es similar al de las peroxidasas, por lo cual podrían considerarse como peroxidasas de diferente especificidad (Dixon y Webb, 1964).

La función fisiológica de la catalasa está sujeta a controversias. Algunos autores consideran que cumple una acción protectora, destruyendo H_2O_2 , que es tóxica para los organismos vivos (Lemberg y Legge, 1949). Otros autores consideran su función como peroxidativa (Keilin y Hartree, 1945).

La catalasa de *Rv. spheroides* contiene cuatro grupos protohematina por molécula (Nichols y Schonbaum, 1963). En algunas catalasas se han encontrado menos de cuatro grupos hematina por molécula, como resultado de la degradación de hematina a pigmentos biliares (Nichols y Schonbaum, 1963; Marks, 1969).

I.3.7. Triptofano pirrolasa

La triptofano pirrolasa, enzima que cataliza la oxidación de triptofano a formilquinurenina, es una hemoproteína. Usando extractos de *Pseudomonas*, $^{18}\text{O}_2$, se demostró que se incorporan dos átomos de oxígeno en la formilquinurenina en las posiciones indicadas con asteriscos (Hayaishi y col, 1957):



reacción 6

La enzima cataliza la oxidación directa del triptofano por oxígeno molecular. Cuando se separa el grupo prostético de la enzima y se lo convierte en piridina hemocromo, su espectro difiere de todos los descritos anteriormente. Se vio que el peróxido era necesario para convertir la enzima férrica inactiva en su forma ferrosa activa.

La enzima es una hemoproteína inusual, ya que en células de hígado de rata, las dos terceras partes de la misma está presente como apoenzima inactiva, que puede activarse por agregado de hematina. La mitad hematínica funciona como un cofactor disociado, más que como un grupo prostético firmemente unido como en otras hemoproteínas. La proto y la mesoporfirina pueden inhibir la actividad enzimática, compitiendo con la hematina por la apoenzima (Marks, 1969).

La administración parenteral de triptofano a ratas aumenta marcadamente el nivel de actividad de esta enzima en el hígado (Knox, 1951). Este aumento se debe a que el triptofano influye en la partición de la hematina entre la apo-triptofano pirrolasa y otras proteínas hémicas en favor de la primera (Feigelson y Greengard, 1962; Schimke y col, 1965).

I.4. Clorofila. Distribución

Las clorofilas comprenden el mayor grupo de pigmentos tetrapirrólicos en organismos fotosintéticos, como puede esperar se dada su importante participación en el proceso fundamental de captación de energía radiante, que es la base del modo de vida fotosintético. Ocupan un lugar similar al de la hemoglobina en animales superiores, que dependen del oxígeno como oxidante final.

Teniendo en cuenta las similitudes estructurales del hemo y la clorofila, ya discutidas, muchos investigadores predijeron que la biosíntesis del protohemo y la clorofila debían seguir caminos comunes.

Esta convicción fue brillantemente confirmada por el descubrimiento de Granick (1948, a y b) sobre mutantes de *Chlorella* que no producían clorofila, pero acumulaban protoporfirina IX o Mg-protoporfirina IX. Además, se demostró que la protoporfirina IX se sintetiza en el cloroplasto de la planta por el mismo camino biosintético que el protohemo en la célula animal (Granick, 1954).

La protoporfirina IX es el último miembro común a los caminos biosintéticos del protohemo y la clorofila a partir del cual, la inserción de hierro lleva a la formación de protohemo y la de magnesio a la de Mg-protoporfirina IX, el precursor de la clorofila.

I.4.1. Clorofila de plantas

La clorofila a es el pigmento más ampliamente distribuido de esta clase, y se encuentra en todas las plantas y algas que dependen de la energía radiante. En plantas superiores y en la mayoría de las algas verdes está acompañada por la clorofila b, mientras que en algas marrones y rojas encontramos clorofilas c y d, respectivamente, en lugar de clorofila b. Las algas azul-verdes sólo contienen clorofila a (Bogorad, 1962).

La concentración de clorofilas en plantas y algas varía considerablemente con la especie, la edad y el entorno. Con nutrientes adecuados, temperaturas moderadas y mediana intensidad de luz, se obtienen mejores rendimientos. Bajo estas condicio-

nes, el contenido total de clorofila de las hojas es de 1% del peso seco, mientras que las algas unicelulares contienen hasta el 5% de su peso seco en clorofila (Rabinowitch, 1945). El contenido de clorofila *a* es comúnmente dos a tres veces mayor que el de *b*, pero esta relación está sujeta a influencias ambientales. La concentración total de clorofila es de 50 a 100 veces mayor que la de hemos.

Las clorofilas se encuentran en los cloroplastos de las plantas superiores y algas, excepto en las algas azul-verdes, que no poseen cloroplastos definidos. Por microscopía electrónica se ha observado que los cloroplastos contienen subunidades o granas, de estructura lamelar, en los cuales se ubican estos pigmentos (Granick, 1961).

Las clorofilas están unidas a complejos lipoproteicos, que pueden ser extraídos con detergentes tales como la digitonina (Kupke y French, 1960).

1.4.2. Clorofilas de Bacterias Fotosintéticas

Se creía que las bacterias sulfúreas rojas (*Thiorhodaceae*) y las bacterias rojas y marrones no sulfúreas (*Athiorhodaceae*) contenían la forma de clorofila llamada bacterioclorofila por Hans Fisher. Sin embargo, este concepto debió modificarse luego de identificarse la bacterioclorofila *b*, en una especie de *Rhodopseudomonas* (Eimhjellen y col, 1963).

Las clorofilas de las bacterias sulfúreas verdes son muy distintas de la bacterioclorofila y tienen el anillo dihidroporfirina de la clorofila *a* (Lascelles, 1963).

La cantidad de clorofila en bacterias fotosintéticas es similar a la existente en algas unicelulares y es cerca de cien veces mayor que la concentración total de hemo. Al igual que en las plantas, los niveles de clorofila en bacterias se ven influidos por los factores ambientales.

La clorofila de las bacterias fotosintéticas está combinada con macromoléculas en los cromatóforos. Estos contienen todo el complemento de pigmentos fotosintéticos, así como citocromos y otros componentes de la cadena de transporte de electrones y son ricos en proteínas y fosfolípidos (Lascelles, 1962).

I.5. Porfirinas

Las porfirinas libres no tienen una función biológica conocida y se acumulan como productos laterales del camino biosintético normal que lleva a los tetrapirroles funcionales, a saber, el hemo y las clorofilas. En circunstancias normales se encuentran sólo pequeñas cantidades de porfirinas. Esto demuestra claramente la altísima eficiencia de los mecanismos de control que operan en esta biosíntesis.

I.5.1. Porfirinas en animales

Los eritrocitos de animales normales contienen pequeñas cantidades de proto y coproporfirina; estas cantidades pueden aumentar 10 veces o más en anemia perniciosa, porfirias e intoxicación por Pb (Schwarz y Wikoff, 1952).

En orinas normales se encuentra coproporfirina y pequeñas cantidades de uroporfirina; se excretan como porfirinógenos, que se oxidan espontáneamente a porfirinas (Falk, 1954). La excreción de copro y uroporfirina en hombres normales es de 100 y 20 μg por día, respectivamente.

En las porfirias, la excreción de porfirinas se encuentra muy aumentada. En cada tipo de porfiria se eliminan diferentes porfirinas, dependiendo de la enzima que se halla específicamente alterada.

I.5.2. Acumulación de porfirinas en organismos no fotosintéticos

Ya en 1947, Pappenheimer mostró que en cultivos de *Corynebacterium diphtheriae* se acumulaban porfirinas, junto con las toxinas, si el medio contenía bajas concentraciones de hierro. La producción de porfirinas y toxinas disminuía si la cantidad de hierro aumentaba hasta un cierto nivel crítico.

Desde ese momento, resultó evidente que existía una relación entre el hierro y la formación de porfirinas. Además del hierro, otras condiciones ambientales influyen en la acumulación de porfirinas. En particular, la anaerobiosis favorece su formación en algunos organismos.

La cantidad de porfirinas en cultivos varía considerablemente, siendo predominante la presencia de coproporfirina III.

El significado de esta acumulación no está totalmente dilucidado. Su correlación con la deficiencia de hierro sugiere que las porfirinas se forman en exceso cuando la habilidad para formar hemoproteínas está limitada (Pappenheimer y Hendee, 1947).

I.5.3. Acumulación de porfirinas por bacterias fotosintéticas

Van Niel (1944) observó que los fluidos de cultivos de bacterias fotosintéticas del grupo de las *Athiorhodaceae* contienen un pigmento rojo, identificado como una mezcla de porfirinas conteniendo coproporfirina III y uroporfirina III (97% y 3%, respectivamente) (Lascelles, 1956).

Estos organismos parecen ser la fuente más rica de porfirinas del mundo microbiano y la acumulación de pigmentos está conectada con la síntesis de bacterioclorofila. Como en bacterias no fotosintéticas, el hierro influye significativamente sobre la acumulación de coproporfirina, que alcanza un máximo en deficiencia del metal. Por otro lado, la concentración de bacterioclorofila en las células es óptima sólo cuando hay un nivel adecuado de hierro, existiendo entonces una relación inversa entre la acumulación de coproporfirina y la formación de bacterioclorofila, gobernada por la cantidad de hierro.

Muchas *Athiorhodaceae* crecen aeróbicamente en oscuridad, pero bajo estas condiciones, tanto la síntesis de bacterioclorofila como la acumulación de porfirinas está reprimida, señalando nuevamente la estrecha vinculación entre la formación de porfirinas y de bacterioclorofila.

I.6. Vitamina B₁₂

El grupo de la vitamina B₁₂ (conocido también como cobalaminas, corfirinas o cobamidas) comprende un gran número de compuestos con un núcleo semejante al de las porfirinas (corrinas), coordinado con un átomo de cobalto. Entre ellos, la cia-

nocobalamina fue la primera identificada químicamente (Figura I.9.).

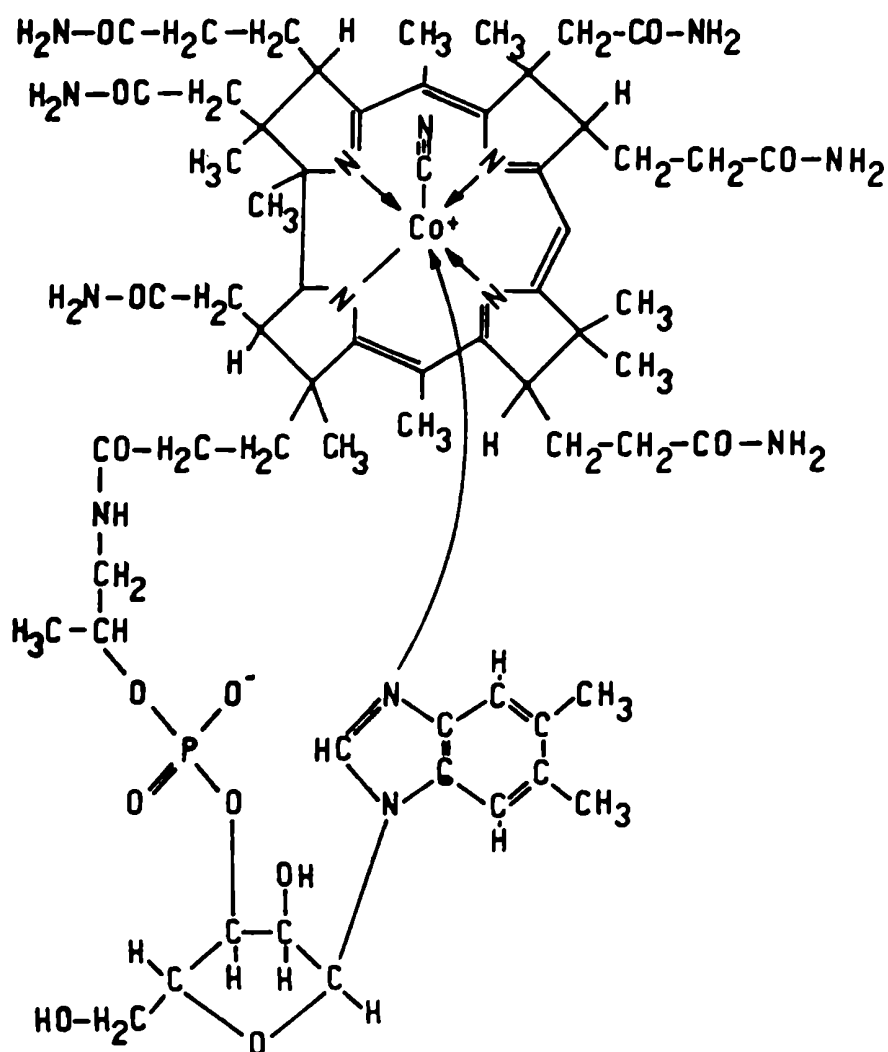


FIGURA I.9.: Cianocobalamina

La estructura del núcleo corrina posee las características de una porfirina. Debe notarse la ausencia del puente metálico entre los anillos A y D. Los distintos derivados de la cianocobalamina varían en los siguientes aspectos:

- 1) el grupo ciano está reemplazado por otros aniones o por un residuo adenosil, siendo los adenosil derivados la forma coenzima de esta vitamina;
- 2) la mitad nucleótida está ausente o sustituida;

3) los grupos corrina carboxamida pueden estar sustituidos, generalmente por grupos propionamida.

Los anillos pirrólicos de la mitad corrina derivan de los mismos precursores que las porfirinas, separándose los caminos a nivel del uroporfirinógeno III.

Las diferencias entre las corrinas y la uroporfirina III son las siguientes:

- 1) Está más reducida que las porfirinas, y contiene anillos pirrolina y pirrolidina, más que anillos pirrólicos.
- 2) La unión entre los anillos A y D se hace a través de una unión covalente directa y no por un puente meteno, y en este lugar hay un grupo metilo adicional.
- 3) La cadena lateral de ácido acético en posición 5 de la uroporfirina III está reemplazada por un grupo metilo y el resto de los grupos acético y propiónico están convertidos en sustituyentes acetamida y propionamida.

Se demostró que la mitad porfirínica se sintetiza, en cultivos de *Actinomycete*, a partir de los mismos precursores que las porfirinas, y que los seis grupos metilo extra derivan del metilo de la metionina, probablemente por un mecanismo de C-alquilación (Bray y Shemin, 1963; Shemin y Bray, 1964).

REFERENCIAS

- Bogorad, L. (1962) *Physiology and Biochemistry of Algae*. Ed. R.A. Lewin. Academic Press - N. York. p. 385.
- Bray, R.C. & Shemin, D. (1963) *J. Biol.Chem.* 238, 1501.
- Dixon, M. & Webb, E. (1964) *Enzymes*. 2nd. Ed. Longmans- London, p. 102.
- Drabkin, D.L. (1951) *Physiol. Rev.* 31, 345.
- Eimhjellen, K.E.; Aasmundrud, O. & Jensen, A. (1963) *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 10, 232.
- Falk, J.E. (1954) *Biochem. Soc. Symp. (Cambridge, Eng.)* 12, 17.
- Feigelson, P. & Greengard, O. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 3714.
- Granick, S. (1948 a) *J. Biol. Chem.* 172, 717.
- Granick, S. (1948 b) *J. Biol. chem.* 175, 333.
- Granick, S. (1954) *Rec. Chem. Prog.* 15, 27.
- Granick, S. (1961) en *The Cell*, Vol II. Ed. J. Brachet y A. G.Mirsky . Academic Press. N. York. p. 489.
- Hayaishi, O.; Rothberg, S.; Mehler, A.H. & Saito, Y. (1957) *J. Biol. Chem.* 229, 889.
- Keilin, D. (1930) *Proc. R. Soc. B.* 106, 418.
- Keilin, D. & Hartree, E.F. (1945) *Biochem. J.* 39, 293.
- Knox, W.E. (1951) *Br. J. Exp. Path.* 32, 462.
- Kùpke, D.W. & French, C.S. (1960) en *Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol V/1. Ed. W. Ruhland, Springer. Verlag, Berlín. p. 298.
- Lascelles, J. (1956) *Biochem. J.* 62, 78.
- Lascelles, J. (1962) *J. Gen. Microbiol.* 29, 47.
- Lascelles, J. (1963) *Symposium on Bacterial Photosynthesis*. Ed. L.P. Vernon- Antioch Press. Yellow Springs. Ohio.
- Lascelles, J. (1964) en *Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation*. Benjamin - New York.
- Lemberg, R. & Legge, J.W. (1949) en *Haematin Compounds and Bile Pigments*. Interscience. N. York. p. 416.
- Marks, G.S. (1969) en *Heme and Chlorophyl* D. Van Nostrand Company. London.

- Newton, J.W. & Kamen, M.D. (1961) en *The Bacteria*. Ed. I. C. Gunsalus y R.Y. Stanier. Academic Press. N. York. Vol II. p. 397.
- Nicholls, P. & Schönbaum, G.R. (1963) en *The Enzymes*. Ed.P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbäck. Academic Press. N. York. Vol. 8, p. 147.
- Pappenheimer, A.M. (1947) *J. Biol. Chem.* 167, 251.
- Pappenheimer, A.M. & Hendee, E.D. (1947) *J. Biol. Chem.* 171, 701.
- Postgate, J.R. (1959) *A. Rev. Microbiol.* 13, 505.
- Rabinowitch, E.I. (1945, 1951, 1956) en *Photosynthesis and Related Processes*. Vols. 1, 2, 3 . Wiley. Interscience. N. York.
- Rabinowitch, E.I. & Govindjée, R. (1965) *Scient. Am.* 213, 74.
- Schimke, R.T.; Sweeney, E.W. & Berlin, C.M. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 322.
- Schwarz, S. & Wikoff, H.M. (1952) *J. Biol. Chem.* 194, 563.
- Shemin, D. & Bray, R.C. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 112, 615.
- Van Niel, C.B. (1944) *Bacteriol. Rev.* 8, 1.
- Vernon, L.P. & Kamen, M.D. (1954) *J. Biol. Chem.* 211, 643.

CAPITULO II

BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

II.1. Estudios isotópicos	26
II.1.1. Utilización del Nitrógeno de la glicina	26
II.1.2. Utilización del átomo de carbono α de la glicina	26
II.1.3. Utilización del acetato	27
II.2. Enzimas del camino de los tetrapirroles	28
II.2.1. Generalidades	28
II.2.2. Succinil CoA-Sintetasa	28
II.2.3. δ -Aminolevúlico-Sintetasa	32
II.2.3.1. Rol del ALA-S	33
II.2.4. DOVA-Transaminasa	35
II.2.5. ALA-Dehidrasa	37
II.2.6. PBG-asa	37
II.2.7. Decarboxilasa	42
II.2.7.1. Decarboxilasa y Porfiria Cutánea Tardía	45
Modelos experimentales	
II.2.8. Coprogenasa	46
II.2.9. Protogen-oxidasa	49
II.2.10. Ferroquelatasa	50
II.3. Catabolismo del Hemo	53
Referencias	57

II. BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

II.1. Estudios isotópicos

La elucidación de los primeros pasos del camino biosintético de las porfirinas fue el resultado de una serie de brillantes estudios con isótopos que constituyeron la base de los trabajos posteriores sobre la bioquímica de porfirinas (Shemin, 1955).

II.1.1. Utilización del Nitrógeno de la glicina

A pesar de la complejidad del núcleo de la porfirina, la gran mayoría de los organismos vivos puede sintetizarlo a partir de constituyentes simples de la dieta. En un principio se había sugerido que la prolina o el anhídrido del ácido glutámico, cuya estructura es cercana a la del pirrol, podían servir como precursores de las porfirinas. Con la introducción de las técnicas isotópicas, fue posible evaluar esta hipótesis. Así Shemin y Rittenberg (1946) administraron a ratas, prolina y ácido glutámico marcado con ^{15}N y encontraron que ninguno de estos aminoácidos era utilizado directamente en la biosíntesis de protoporfirina IX. Entonces se ensayaron otros aminoácidos marcados con ^{15}N , observándose que la glicina se incorporaba en la mitad hémica de la hemoglobina en ratas y humanos (Shemin y Rittenberg, 1945, 1946). Por degradación del hemo marcado a maleimidias, se demostró que el átomo de nitrógeno de la glicina era el precursor de los cuatro átomos de nitrógeno del hemo (Wittenberg y Shemin, 1949; Muir y Neuberger, 1949).

II.1.2. Utilización del átomo de carbono α de la glicina

Usando glóbulos rojos de pato y (2- ^{14}C)glicina, Radin y col (1950) demostraron que el átomo de carbono α de 8 moléculas de glicina era utilizado en la síntesis de protoporfirina IX; ésto fue confirmado por Muir y Neuberger (1950) (Figura II.1). En cambio, el átomo de carbono carboxílico de la glicina no se utiliza en la biosíntesis de protoporfirina (Radin y col, 1950).

II.1.3. Utilización del acetato

De gran importancia en la elucidación del origen de los restantes veintiseis átomos de carbono de la protoporfirina IX fue la observación de Bloch y Rittenberg (1945), quienes encontraron que se producía hemo-deuterado cuando se administraba acetato marcado con Deuterio a ratas. Sobre la base de esta experiencia se ensayó el ácido acético marcado con ^{14}C como precursor del hemo, detectándose incorporación de ambos átomos de carbono (Muir y Neuberger, 1950). Paralelamente Shemin y Wittenberg (1951) demostraron también que los átomos de carbono del ácido acético eran la fuente de los veintiseis carbonos de la protoporfirina IX (Figura II.1.).

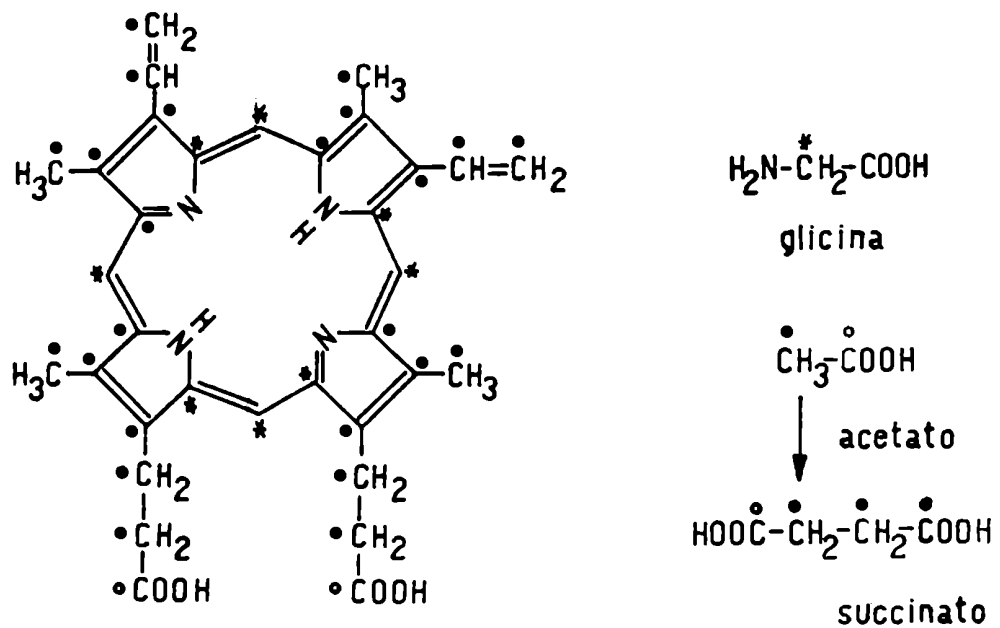


FIGURA II.1.: Origen de los átomos de carbono de la Protoporfirina IX.

En realidad, el acetato a través del ciclo del ácido cítrico, se convierte en succinato, cuya forma activa, la succinil-CoA es el precursor directo de las porfirinas.

II.2. Enzimas del camino de los tetrapirroles

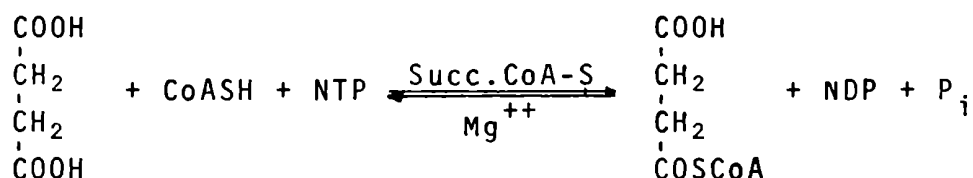
II.2.1. Generalidades

La capacidad de sintetizar hemo es común a todas las células aeróbicas de animales, plantas y bacterias. La hemoglobina, mioglobina, varios citocromos, catalasas, peroxidasa y otras hemoproteínas contienen hemo como grupo prostético. Además de la hierro-protoporfirina (hemo), las células vegetales también sintetizan Mg-protoporfirina como precursor de la clorofila.

Un esquema de la biosíntesis de porfirinas se ilustra en la Figura II.2.

II.2.2. Succinil CoA-Sintetasa

La Succinil CoA-Sintetasa (Succ.CoA-S) cataliza reversiblemente la activación del carboxilo del ácido succínico con CoA, en presencia de un nucleósido trifosfato, de acuerdo con la siguiente reacción:



reacción 1

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

En la mayoría de los tejidos la Succ.CoA-S es una enzima particulada, mitocondrial o cloroplástica. Es altamente específica para el succinato y CoA, mientras que con respecto al nucleósido trifosfato, la especificidad varía según el origen de la proteína; la enzima de mamíferos puede emplear GTP o ITP (Cha & Park, 1964), mientras que en tejidos vegetales o bacterianos es específica para ATP (Nandi & Waygood, 1965; Wider de Xifra & Tijer, 1971).

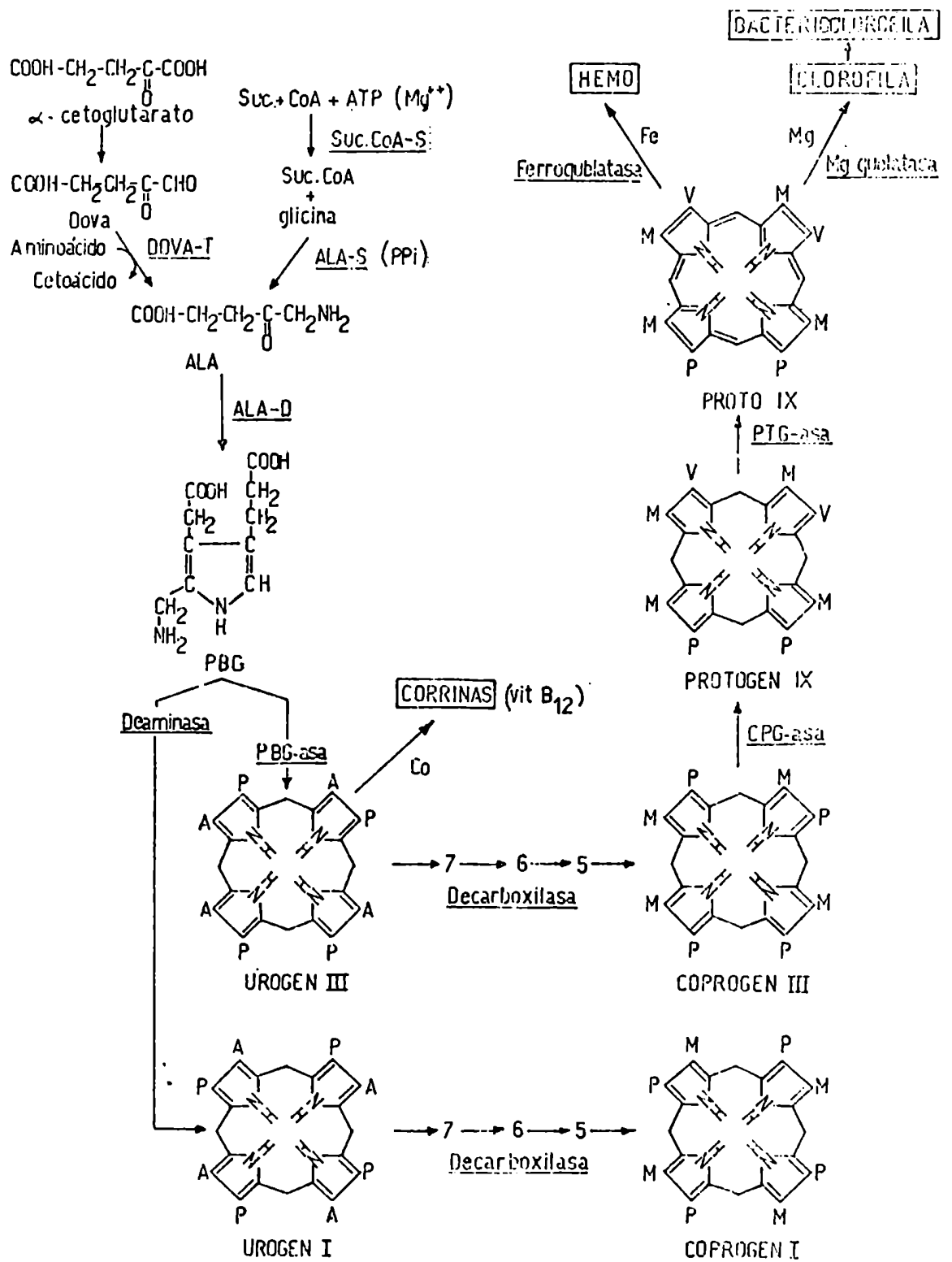


FIGURA II.2.: Esquema de la biosíntesis de tetrapirroles

La Succ.CoA-S requiere la presencia de un catión divalente para un máximo de actividad; en la mayoría de los tejidos estudiados, estos cationes son Mg y Mn.

Presenta frecuentemente las características de una enzima sulfhidrónica, siendo inhibida por p-cloromercuribenzoato, iodobenzoato, iodoacetamida, glutatión oxidado y N-etilmaleimida. En algunos tejidos es necesaria la presencia de glutatión reducido (GSH) para la activación de la enzima. Sin embargo, otros tioles, como cisteína, tioglicolato y ditiotreitól producen inactivación (Wider de Xifra y Tigier, 1971).

El peso molecular de la Succ.CoA-S varía según la fuente de obtención, oscilando sus valores entre 70.000 y 140.000 daltons. Mediante el empleo de agentes disociantes se encontró que la enzima está compuesta por cuatro subunidades, del tipo $\alpha_2\beta_2$; los pesos moleculares de cada una de las subunidades α y β son 29.000 y 41.000 daltons respectivamente.

La participación de la enzima fosforilada, como intermedio obligatorio en la reacción catalizada por la Succ.CoA-S, sugerida por Kaufman en 1955, se demostró en varios tejidos diferentes (Kaufman y col, 1950; Kaufman y Alivisatos, 1955; Nishimura, 1967). En fracciones proteicas enriquecidas en Succ.CoA-S se detectó la presencia de una fosfohistidina, demostrándose que la unión se realizaba a través del N-3 de un residuo histidínico (Shemin y Rittenberg, 1951; Kreil y Boyer, 1964). Empleando ATP- ^{32}P y extractos libres de células, se encontró que la mayor parte de la radioactividad quedaba asociada a la fracción proteica que contenía Succ.CoA-S (Ra Maley y col, 1967; Wider de Xifra y col, 1972). Utilizando las técnicas más recientes de insolubilización se confirmó la existencia del complejo enzima-P (Wider de Xifra y col, 1972).

En hojas de espinaca, se midió el intercambio entre los átomos de ^{32}P del fosfato inorgánico y el fosfato terminal del ATP. La enzima purificada catalizaba el intercambio entre $^{32}\text{ATP} \rightleftharpoons ^{32}\text{ADP}$ (Gibson y col, 1967; Cha y col, 1967 a; Kaufman y Alivisatos, 1955).

En *E. coli* y en mamíferos se demostró intercambio entre ^{18}O del fosfato y el carboxilo del succinato (Hacer, 1957; Kohn, 1951). También se observó intercambio catalizado por la Succ.CoA-S de extractos de espinacas (Kaufman y Alivisatos, 1955),

corazón de cerdo (Cha y col, 1967 b) y *E. coli* (Moyer y col, 1967), entre ^{14}C -succinato y succinil-CoA, estimulado por el fosfato inorgánico.

En extractos de callos de soya, Wider y Batlle (1976), demostraron la formación del complejo enzima-CoA, observando que la Succ.CoA-S se combina fácilmente con la CoA libre o con la CoA en presencia de ATP y Mg, sugiriéndose como un intermediario de la reacción enzimática al complejo ternario $\text{E}^{-\text{P}}_{\text{-CoA}}$; este complejo podría ser relativamente inestable y disociarse con facilidad, según las condiciones. De acuerdo con los datos obtenidos se propuso que podría existir más de un sitio de unión para la CoA, con diferentes propiedades energéticas (Wider de Xifra y Batlle, 1976).

La fosforilación de la Succ.CoA-S nativa con ^{32}ATP y ^{32}GTP , muestra que la radiactividad se asocia a la subunidad α (Teherani y Nishimura, 1975). El sitio de unión para el succinato y posiblemente para los restantes sustratos estarían localizados en la subunidad β o podría abarcar parte de ambas subunidades $\alpha\beta$. Para la reacción total son necesarias ambas subunidades, de manera que la enzima nativa presentaría dos sitios activos, proponiéndose que el sitio activo podría estar armado en el punto de contacto de las dos subunidades en el oligómero $\alpha_2\beta_2$ (Pearson y Bridger, 1975).

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

Uno de los esquemas más recientes, que tiene en cuenta todas las evidencias experimentales acumuladas hasta ese momento, y que plantea la posibilidad de caminos alternativos, o aún, eventualmente no enzimáticos, y considera además todos los otros mecanismos postulados, se ilustra en la Figura II.3. En este diagrama se explican también la formación y detección de otros complejos, cuya existencia ha sido muy discutida, pero sin embargo no debemos descartar la posibilidad de que podrían resultar de una alteración de los equilibrios del camino nor-

mal, y consecuentemente, de una desviación por esas vías laterales (Wider de Xifra y Batlle, 1976).

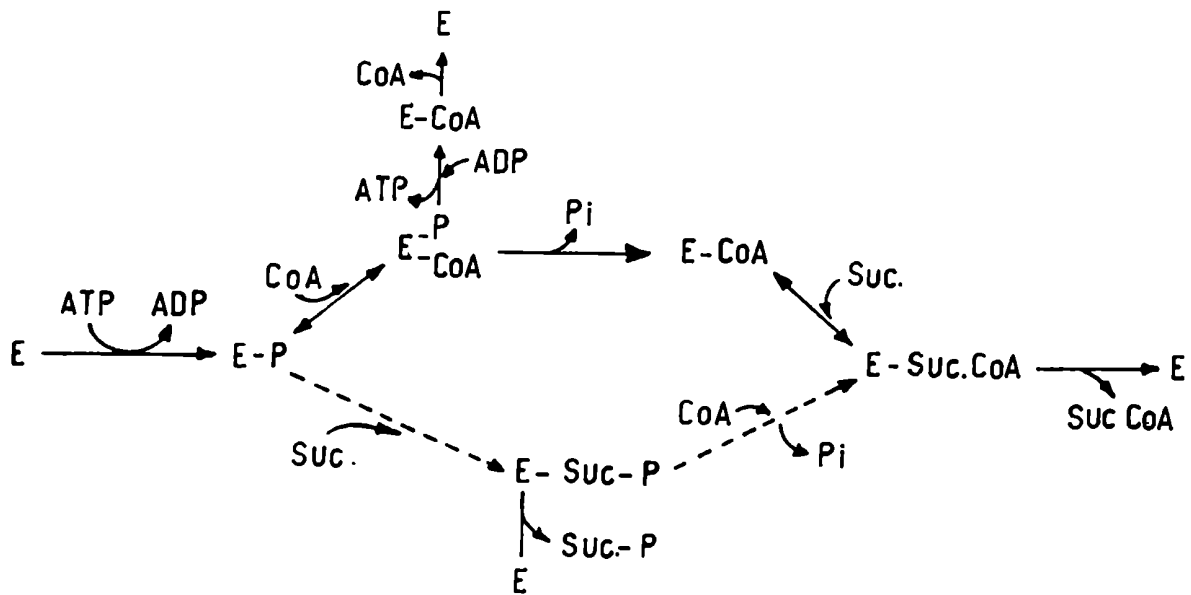


FIGURA II.3.: Mecanismo de acción de la Succinil-CoA-Sintetasa

II.2.3. δ -Aminolevúlico Sintetasa

La primera etapa que conduce específicamente a la biosíntesis de tetrapirroles es la formación de ALA, a partir de Succ.CoA y glicina, por acción de la enzima δ -aminolevúlico-Sintetasa (ALA-S). Esta enzima fue detectada en extractos libres de células de *Rp. spheroides* (Kikuchi y col, 1958 a; Gibson y col, 1958; Burnham y Lascelles, 1963), *Rp. rubrum* (Kikuchi y col, 1958 b), *Rp. palustris* (Viale y col, 1980), eritrocitos de aves (Brown, 1958; Laver y col, 1958), hígado de cobayo (Granick y Urata, 1963), rata (Marver y col, 1966), espinaca (Miller y Teng, 1967) y extractos de callos de soya (Wider de Xifra y col, 1971). Sin embargo, no ha podido detectarse en proplástidos y cloroplastos, como tampoco en la fracción mitocondrial de plantas superiores (Porra y Irving, 1970). La primera detección en un sistema vegetal fue reportada por Wider de Xifra y col (1971).

En la mayoría de los tejidos estudiados, el ALA-S se encuentra asociada a la fracción particulada. En hígado de rata se la ha localizado tanto en mitocondrias como en la fracción

soluble (Sano y Granick, 1961; Hayashi y col, 1969, 1970).

El fosfato de piridoxal es indispensable para el funcionamiento de esta enzima (Kikuchi y col, 1958; Laver y col, 1958; Lascelles, 1957). Respecto a la especificidad del ALA-S por sus sustratos, se encontró (Kikuchi y col, 1959) que la enzima es altamente específica respecto a la Succ.CoA, con una baja capacidad para condensar otros acil-CoA con glicocola. El ALA-S presenta características de enzima sulfhidrónica.

En la mayoría de los tejidos, el ALA-S se caracteriza por su gran inestabilidad y vida media corta, lo que ha hecho difícil su estudio y purificación.

En cuanto al mecanismo de acción del ALA-S se ha propuesto que la glicocola se condensa con el fosfato de piridoxal, parte constituyente de la proteína enzimática, formando un carbanión estable que luego reacciona con el átomo de carbono del carbonilo electrofílico de la Succ.CoA para producir un intermediario muy inestable, el ácido α -amino β -cetoadípico, que aún unido a la enzima se decarboxila espontáneamente a ácido δ -aminolevúlico (Figura II.4.).

II.2.3.1. Rol del ALA-S

La síntesis de los tetrapirroles está controlada principalmente por cambios en la actividad del ALA-S. Esta es la enzima limitante y juega un papel fundamental en la regulación de la biosíntesis del hemo.

Uno de los mecanismos por medio de los cuales se regula la actividad del ALA-S se conoce como "control por feed-back" o por producto final. Este es un mecanismo rápido, en el cual el hemo actúa sobre la primera enzima del camino, el ALA-S.

Además de este mecanismo, se ha demostrado que existe un control genético de la síntesis de ALA-S, dependiente de DNA. El gen regulador del operón hemo induciría la síntesis de un apo-represor proteico, que en presencia de hemo actuaría como co-represor y formaría el represor activo de la síntesis del ALA-S. Los inductores de porfiria desplazarían al hemo de su combinación con el apo-represor, impidiendo la formación del represor activo y produciendo, consecuentemente, un aumen-

to de la síntesis de ALA-S.

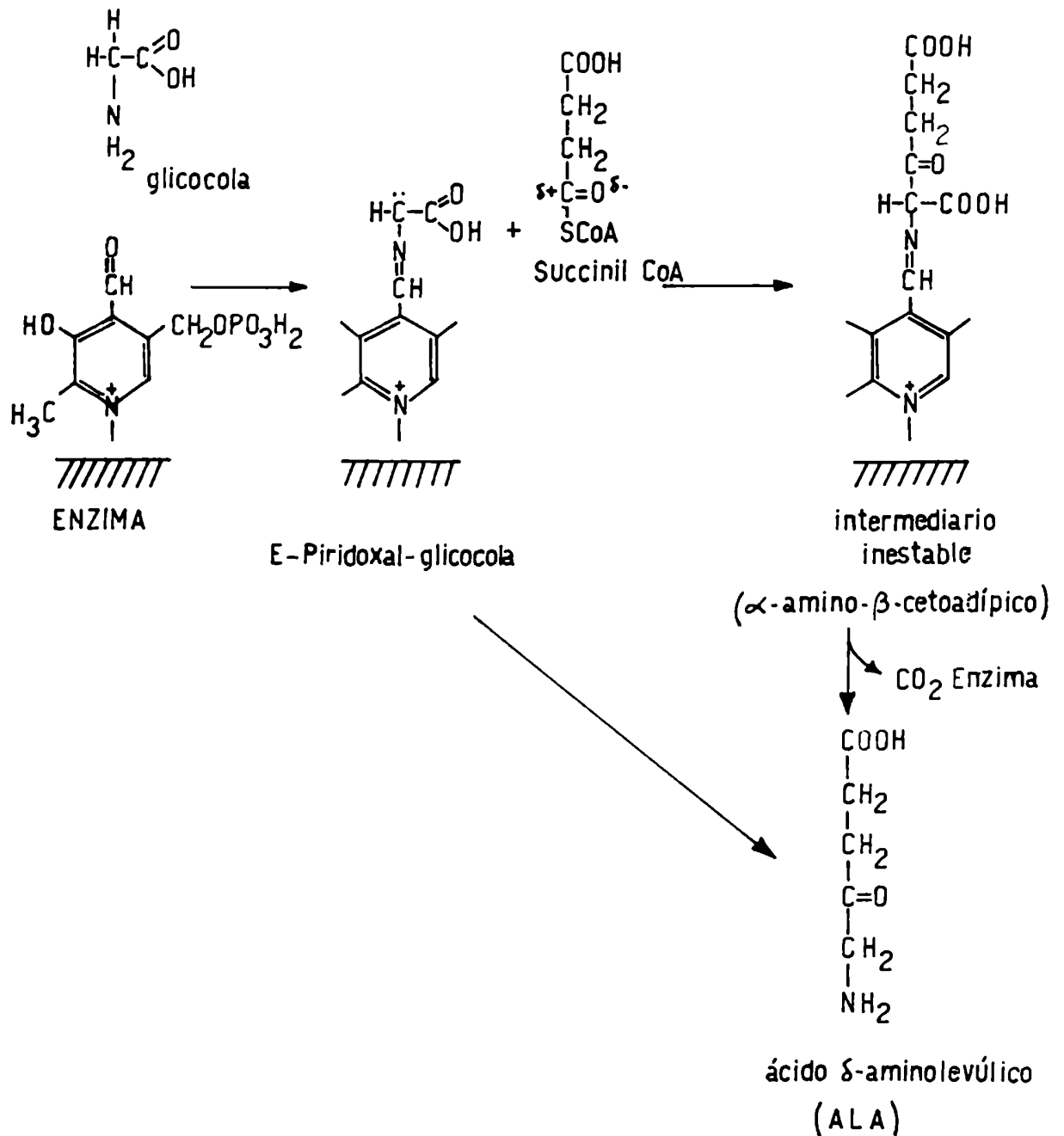


FIGURA II.4.: Mecanismo propuesto para la formación enzimática de ALA

De manera que el hemo controla su propia síntesis, actuando rápidamente por un mecanismo feed-back inhibiendo la actividad del ALA-S y, más lentamente, por un mecanismo de represión, deteniendo la síntesis proteica del ALA-S.

Además, la actividad del ALA-S estaría controlada por la

presencia de un compuesto de bajo PM, una cistina trisulfuro, que es capaz de convertir una forma inactiva del ALA-S en una forma de alta actividad, según las necesidades de la célula. La formación de este activador está catalizada por una enzima, la Cistationasa, mientras que otra enzima, la Rodenasa, cataliza la degradación de la cistina trisulfuro. Es decir que estas enzimas, involucradas en el metabolismo de los compuestos sulfurados, controlan el contenido intracelular del activador del ALA-S, la cistina trisulfuro.

II.2.4. DOVA-Transaminasa

En 1955, administrando 5-¹⁴C-ALA a ratas, Shemin y col observaron radiactividad en el CO₂ respiratorio, formiato urinario y el grupo ureído del ácido úrico. Esto dio origen a una serie de reacciones que constituyen lo que se conoce como ciclo del succinato-glicina o ciclo de Russell y Shemin (Figura II.5.). Se supone que el ALA, formado por condensación de la glicina con el succinato, podría deaminarse a γ,δ -dioxovalerato (DOVA), el cual al perder el grupo carbonilo terminal regeneraría el succinato, dando un fragmento de un átomo de carbono (proveniente del C-2 de la glicina) capaz de participar luego de las reacciones de biosíntesis de purinas.

Cuando se administró a palomas y patos 5-¹⁴C-ALA, se detectó radiactividad en formiato, el grupo ureído de guanina, y en menor grado en hemo (Nemeth y col, 1958). La existencia del ciclo se confirmó luego exhaustivamente en *Rhodospirillum rubrum* (Shigesada, 1972).

En 1961, Gibson y col demostraron que el equilibrio en la reacción de transaminación está desplazado en favor de la formación de ALA a partir de DOVA. Efectivamente, incubando un extracto enzimático de *Rhodopseudomonas spheroides* con DOVA y L-alanina o β -alanina, obtuvieron ALA y piruvato. Posteriormente, Neuberger y Turner, en 1963, aislaron, purificaron y caracterizaron la γ,δ -dioxovalerato transaminasa (DOVA-T) de esta misma bacteria fotosintética.

Gassman y col (1968) utilizando una fracción enzimática de *Chlorella vulgaris* midieron síntesis de ALA a partir de DOVA, realizando estudios cinéticos de la reacción de transaminación y determinando especificidad de aminoácidos. En este mismo orga

nismo, Beale (1971) observó acumulación de ALA cuando se lo hacía crecer a la luz en presencia de ácido levulínico. El ácido levulínico es un inhibidor competitivo del ALA-Dehidrasa (Nandi y Shemin, 1968), que evita la conversión de ALA a PBG, inhibiendo la síntesis de porfirinas y por ende, la formación de clorofila.

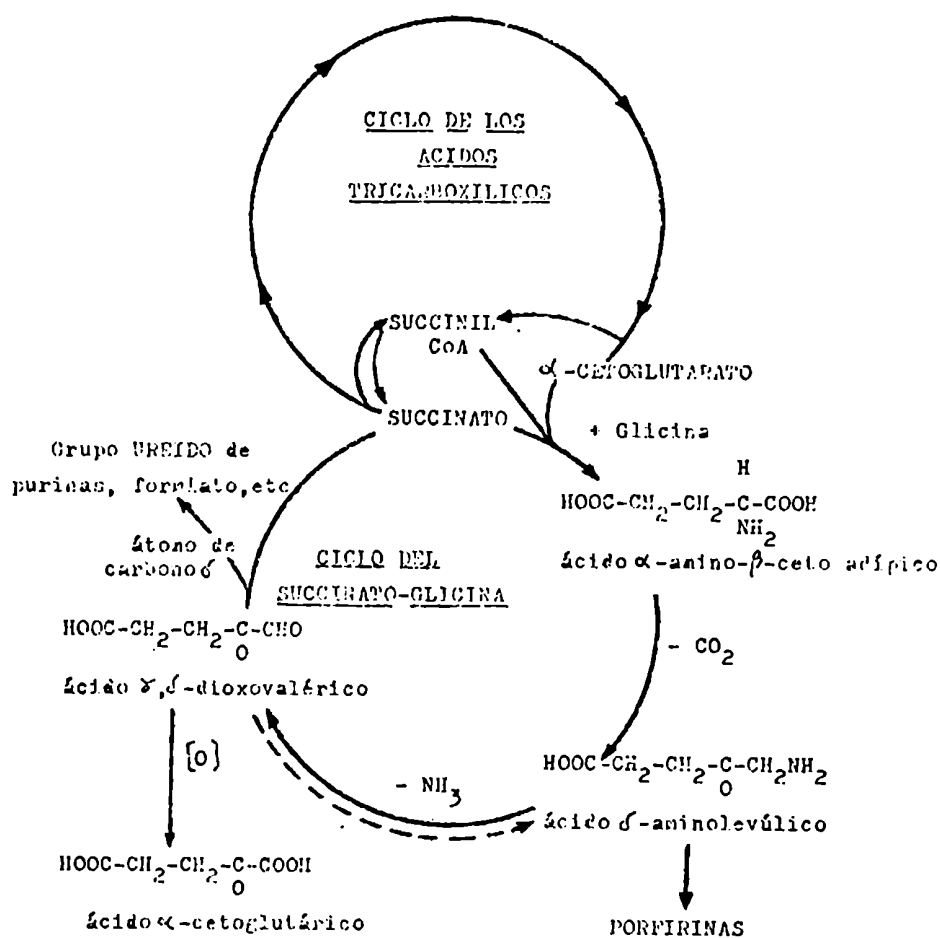


FIGURA II.5.: Ciclo del succinato-glicina.

Beale y Castelfranco, trabajando en presencia de ácido levulínico, con cotiledones de pepino enverdecidos (1973) y hojas de cebada y poroto enverdecidas (1974), midieron radiactividad en el ALA formado a partir de glutamato, glutamina, α-cetoglutarato, succinato y glicina marcados con ^{14}C . Encontraron que los compuestos de cinco átomos de carbono: glutamato, glutami

na y α -cetoglutarato, se incorporaban intactos en el ALA y en forma más eficiente que el succinato y la glicina. Estos resultados confirmaron la existencia en plantas superiores de una ruta alternativa de síntesis de ALA.

En la Figura II.6. se esquematizan las dos vías de síntesis de ALA, que partiendo de ácido glutámico, operarían en bacterias y tejidos animales (Kikuchi y col, 1958) y en plantas superiores (Beale y col, 1975).

En plantas superiores se han purificado parcialmente dos enzimas que catalizan la conversión de α -cetoglutarato a DOVA, y de DOVA a ALA (Lohr y Friedmann, 1976).

Con respecto al mecanismo de acción, algunos autores le adjudican un clásico mecanismo ping-pong, típico de las transaminasas (Noguchi y Mori, 1981), mientras que otros postulan un mecanismo ping-pong con ciertas características particulares (Varticovski y col, 1980). Todos coinciden en que las dos formas enzimáticas estables, a través de las cuales actuaría la DOVA-T, corresponden a los complejos enzima-fosfato de piridoxal y enzima-fosfato de piridoxamina. El aminoácido se uniría con la primera de estas formas; mientras que el DOVA lo haría con la segunda de ellas.

La reacción catalizada por la DOVA-T difiere de la mayoría de las reacciones de transaminación, por su irreversibilidad.

En cuanto a si esta enzima tiene o no importancia a nivel regulatorio, aún no ha sido dilucidado.

II.2.5. ALA-Dehidrasa

Por cuanto el estudio de esta enzima constituye parte fundamental de este trabajo de Tesis, en el capítulo III nos ocuparemos con mayor extensión y detalle acerca de ella.

II.2.6. PBG-asa

Se denomina PBG-asa al complejo enzimático que cataliza la ciclación de cuatro moléculas de PBG para dar el Uroporfirínógeno III (UROGEN III), el intermediario fisiológico en la bio-

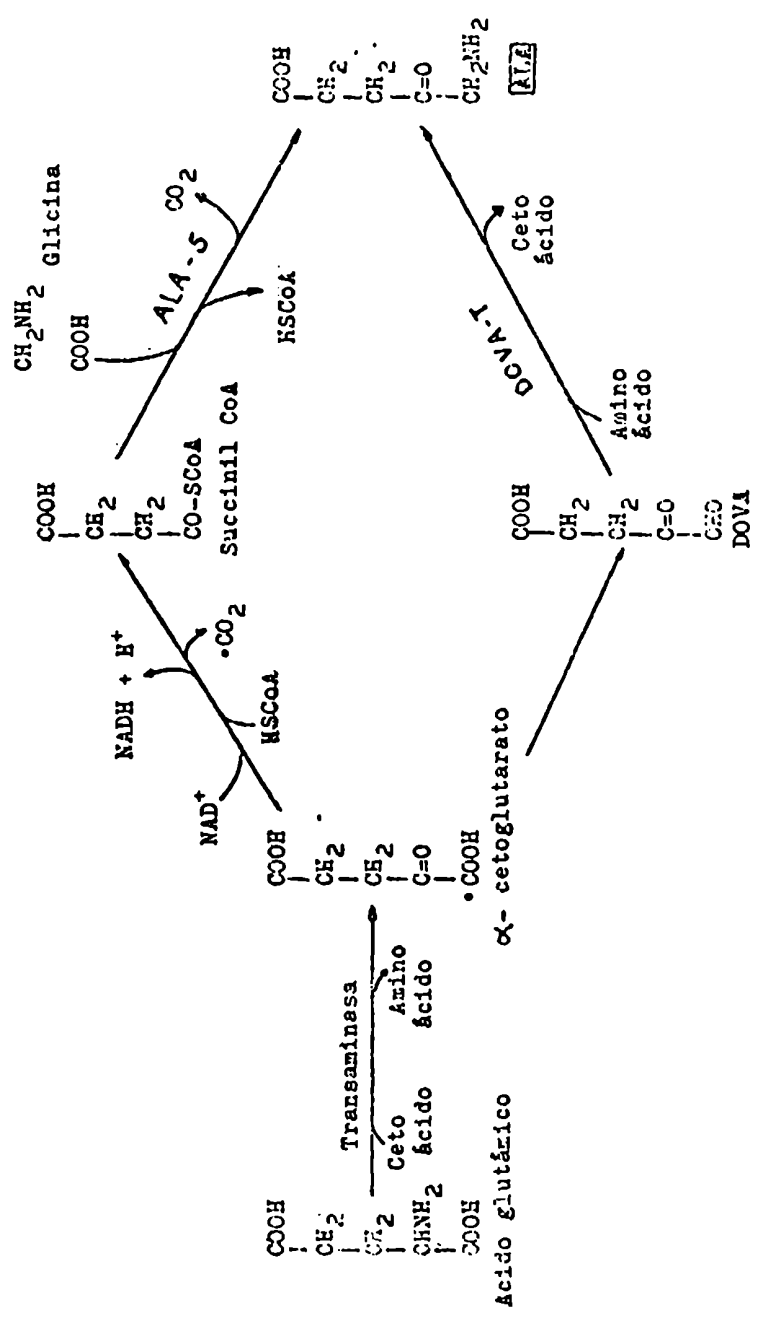


FIGURA II.6.: Caminos biosintéticos para la formación de ALA partiendo de un mismo sustrato, el ácido glutámico.

síntesis de Hemo, clorofilas y corinas.

La PBG-asa es una combinación de, por lo menos, dos enzimas: la Uroporfirinógeno I sintetasa o Deaminasa y la Uroporfirinógeno III-Cosintetasa o Isomerasa.

Actuando sola la Deaminasa convierte 4 moléculas de PBG en una de Uroporfirinógeno I (Urogen I), por medio de una condensación cabeza-cola con eliminación de amoníaco y cierre final del anillo. La Isomerasa, en cambio, no usa al PBG como sustrato ni tampoco actúa sobre el Urogen I; sin embargo, cuando se encuentra asociada con la Deaminasa, formando el complejo de la PBG-asa, transforma 4 moléculas de PBG en el UROGEN III, el isómero asimétrico, por medio de condensaciones sucesivas con eliminación de amoníaco e inversión de uno de los anillos.

Este sistema enzimático se ha detectado en tejidos de numerosas fuentes, tales como bacterias, algas, protozoos, plantas superiores, eritrocitos de conejo, aves y humanos e hígado bovino (ver referencias en Batlle y Rossetti, 1977).

En la mayoría de los tejidos estudiados, la PBG-asa es una enzima citoplasmática. Sin embargo, Bogorad (1955 a y b), Falk y Dresel (1960) y Carel y Kahn (1964), encontraron que su actividad estaba asociada a fracciones particuladas. Más tarde, Rossetti (1978) detectó actividad enzimática tanto en fracciones particuladas como solubles de *Euglena gracilis*.

La PBG-asa, así como sus componentes, Deaminasa e Isomerasa, se han aislado y purificado a partir de una amplia variedad de fuentes, y estudiado sus propiedades.

La determinación de los pesos moleculares de estas enzimas ha revelado que sólo para la Deaminasa parece haber uniformidad, siendo el valor reportado para la enzima de distintas fuentes 40.000. Sin embargo, no puede decirse lo mismo para la Isomerasa y PBG-asa, lo que ha llevado a postular que, según las condiciones, ya sea *in vivo* o *in vitro*, se produce un fenómeno de asociación-disociación entre ambos componentes de la PBG-asa, así como con la Isomerasa aislada (Rossetti y col, 1980).

La PBG-asa, Deaminasa e Isomerasa, son enzimas sulfhidrúlicas; los grupos -SH podrían estar involucrados en el centro activo de las enzimas, así como intervenir en la asociación de la Deaminasa con la Isomerasa, para formar el complejo activo

de la PBG-asa.

La Deaminasa es una enzima termoestable, mientras que la Isomerasa es termolábil. Esta importante diferencia es a menudo utilizada para separar ambos componentes proteicos de la PBG-asa.

Los estudios cinéticos indican que, según las fuentes, este complejo puede presentar las características de una proteína alostérica. Así, en algunos tejidos se observa cooperatividad positiva (Sancovich y col, 1969; Llambías y col, 1971) y en otros casos cooperatividad negativa (Llambías y Batlle, 1970 a y b), ésto demuestra que la entrada de la primer molécula de PBG controla, de algún modo, la entrada de las siguientes.

Rossetti (1978) obtuvo una curva hiperbólica para la formación de producto y sigmoidea para el consumo de PBG, al estudiar la cinética de la PBG-asa en *E. gracilis*. Esto nos indica que el comportamiento cinético de esta enzima varía ampliamente con el sistema en estudio.

Con respecto al mecanismo de acción del complejo PBG-asa en ciertos tejidos se han detectado y aislado, en condiciones normales, intermediarios polipirrólicos (Llambías y Batlle, 1970 c, 1971, a y b; Rossetti y col, 1977), que según la fuente y el tipo de reacción varían en longitud y estructura. Estos hallazgos son de fundamental importancia para la dilucidación de este mecanismo de acción, puesto que permiten la identificación de las etapas intermedias entre PBG y uroporfirinógeno.

Se ha encontrado que tanto los polipirroles de cadena abierta obtenidos en condiciones normales, como aquellos conseguidos en presencia de inhibidores de las enzimas, se comportan como intermediarios de la reacción pero no como sustratos.

Paralelamente, por síntesis química, se han obtenido la mayoría de estos bilanos, así como otros análogos con estructuras relacionadas, llegándose a la conclusión de que aquellos que poseen el tipo de la serie III pueden actuar como intermediarios normales en la síntesis de UROGEN III, en tanto que los de la serie I inhiben la formación de UROGEN III y sólo pueden incorporarse en el UROGEN I.

En base a todas estas evidencias experimentales Batlle y Rossetti (1977) postularon el mecanismo de acción de la PBG-asa que se ilustra en la Figura II.7.

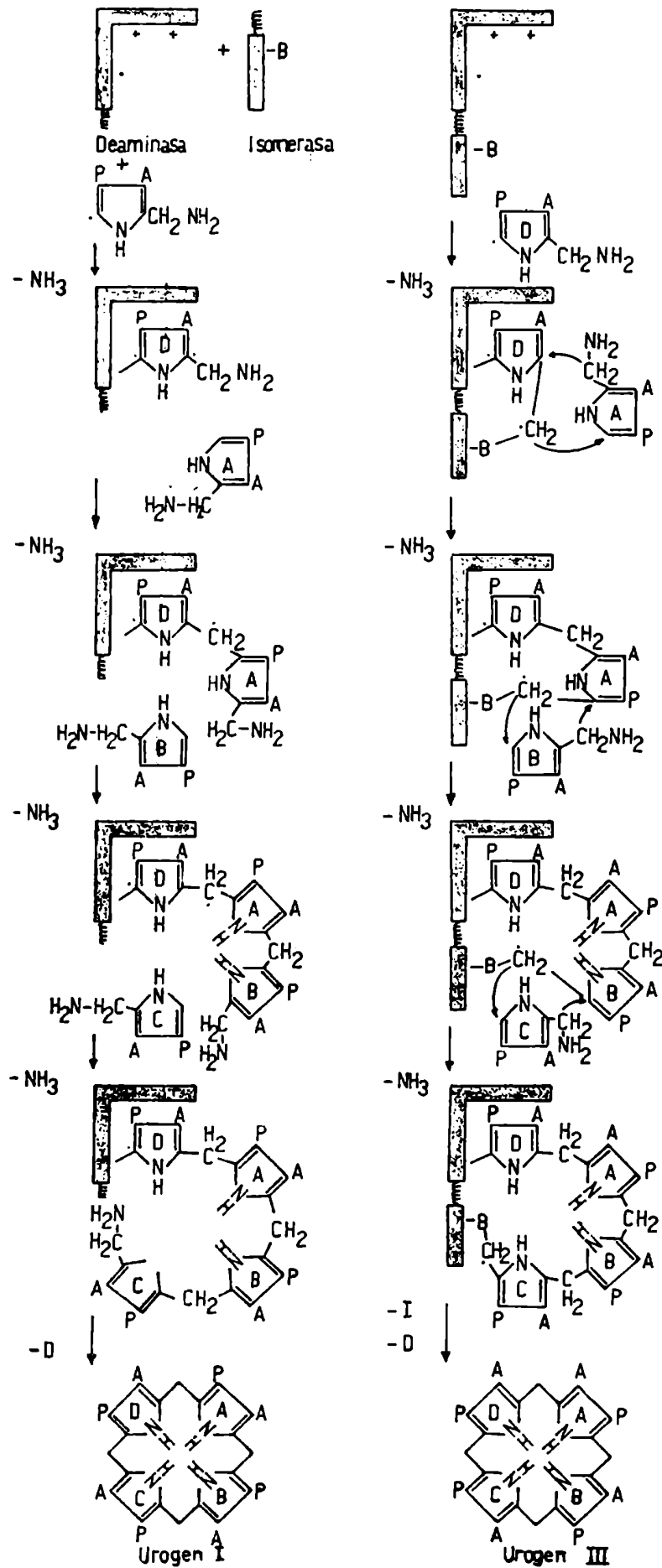


FIGURA II.7.: Mecanismo propuesto para la formación enzimática de Uroporfirinógenos I y III a partir de PBG

Podemos decir que hasta el presente, hay acuerdo entre los diferentes grupos de trabajo en cuanto a la existencia de los intermediarios aminometilpirrilmétanos; sin embargo se difiere en cuanto al momento en el cual ocurre la isomerización.

Battersby y col (1977, a, b y c) sugieren que el proceso de reordenamiento tendría lugar después de la formación de un bilano lineal no-isomerizado, mientras que las propuestas de nuestro laboratorio (Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti, 1978) indican que la isomerización podría ocurrir en la etapa inicial de condensación de las dos primeras moléculas de PBG.

Más tarde, el grupo de Scott encontró que la Deaminasa forma un Preuroporfirinógeno, que sería el sustrato natural de la Isomerasa (Burton y col, 1979; Jordan y col, 1979; Jordan y Sheera, 1979).

Recientemente, Battersby y col (1980) postularon que la Isomerasa actuaría sobre el hidroximetilbilano produciendo la isomerización del anillo D seguida de una rápida ciclización.

Como vemos, si bien los diferentes mecanismos propuestos para explicar la acción conjunta de la Deaminasa e Isomerasa son coincidentes en varios aspectos, todavía no existe un total acuerdo, quedando aún por esclarecer el complejo pero fascinante mecanismo de acción de la PBG-asa.

II.2.7. Decarboxilasa

La Uroporfirinógeno Decarboxilasa o Uroporfirinógeno carboxilasa, llamada comúnmente Decarboxilasa, es la enzima que cataliza la conversión de Uroporfirinógeno III (I) en Coproporfirinógeno III (I), por decarboxilación de las cuatro cadenas laterales de ácido acético del sustrato a los cuatro restos metilo del producto. Esta enzima ha sido estudiada en *Chlorella vulgaris* (Bogorad, 1955 a y b, 1958), *Rhodospseudomonas spheroides* (Hoare y Heath, 1958 a), bazo de ratón (Romeo y Levin, 1971), eritrocitos de aves (Tomio y col, 1970; Batlle y Grinstein, 1964; Hoare y Heath, 1958 b) y humanos (Elder y Tobei, 1977; Elder, 1982; Booy y Rimington, 1957), glándula de Harder (Tomio y Grinstein, 1968); hígado de rata (Aragónés y col, 1972); hígado de cerdo (Kushner y col, 1975) y reticulocitos de conejo (Granick y Mauzerall, 1958 a).

La detección de intermediarios de 7, 6 y 5 carboxilos en la formación enzimática de Coproporfirinógeno, ha sugerido que el proceso ocurre en etapas (Batlle y Grinstein, 1962; 1964), aceptándose hasta el presente, que una sola proteína enzimática estaría involucrada en esta reacción (Batlle, 1973), pese a que este punto aún no está definitivamente resuelto. Elder (1982),¹⁹⁷⁷) informó acerca de la purificación de la Decarboxilasa de eritrocitos humanos, la cual, aparentemente, consistiría en una única proteína formada por dos subunidades; este mismo autor ha sugerido, además, que existirían dos clases de sitios catalíticos por molécula de enzima, confirmando los resultados de Tomio y col (1970).

Varios hechos experimentales sustentan la teoría de que la decarboxilación de Uroporfirinógenos es un proceso en etapas. Se han encontrado intermediarios tetrapirrólicos con 7,6 y 5 carboxilos en materiales biológicos de pacientes porfíricos (Grinstein y col, 1945; Canivet y Rimington, 1953). Asimismo, en estudios de biosíntesis de porfirinas *in vitro* a partir de precursores simples, se detectaron estos mismos intermediarios (Mauzerall y Granick, 1958; Hoare y Heath, 1959; Lascelles, 1956; Falk y col, 1956; Batlle y Grinstein, 1962).

Estas evidencias llevaron a postular que los porfirinógenos de estas porfirinas con 7, 6 y 5 carboxilos debían ser los intermediarios normales en el camino del Hemo. En 1962, Batlle y Grinstein verificaron la identidad de la porfirina heptacarboxílica biosintética, con la aislada de orina, de igual número de carboxilos; se demostró también, utilizando técnicas de marcación directa con ^{14}C y por dilución isotópica, que el porfirinógeno de 7 carboxilos era un intermediario normal en este camino biosintético entre el Uroporfirinógeno y el Coproporfirinógeno. Más tarde, San Martín de Viale y Grinstein (1968) comprobaron que los porfirinógenos hexa y pentacarboxílicos eran, asimismo, intermediarios normales en la biosíntesis del hemo.

La Decarboxilasa actúa muy específicamente sobre los restos acético; sin embargo, no es tan específica en cuanto al tipo isomérico, ya que es capaz de decarboxilar los 4 isómeros posibles del Uroporfirinógeno. De todos modos, existe un grado de relativa selectividad en este aspecto, pues se ha comprobado que la velocidad de decarboxilación varía de acuerdo con el tipo isomérico, habiéndose observado el siguiente orden: III > IV > II > I, para reticulocitos de conejo (Mauzerall y Granick, 1958).

En la mayoría de los tejidos, la Decarboxilasa es una enzima citoplasmática.

En general, el oxígeno suele inhibir significativamente a esta enzima. Este efecto había sido atribuido (Mauzerall y Granick, 1958) a la oxidación que sufrirían los sustratos, aunque no puede descartarse una acción directa sobre la enzima. De todos modos, la enzima ha sido ensayada en anaerobiosis y en aerobiosis (Tomio y col, 1970).

La decarboxilasa es una enzima sensible al calor (Tomio y col, 1970; Romeo y Levin, 1971) y es una enzima sulfhidrúlica. Así, el GSH (Mauzerall y Granick, 1958; Tomio y col, 1970) y el β -mercaptoetanol (Hoare y Heath, 1958 b) poseen un efecto activador, aunque la C₂H₅SH, en iguales condiciones, la inhibe (Tomio y col, 1970). Como era de esperar, los metales pesados, la iodoacetamida, el PCMB y el DTNB la inactivan (Tomio y col, 1970; Hoare y Heath, 1958 b; Romeo y Levin, 1971). La Decarboxilasa proveniente de eritrocitos humanos y de aves también se inhibe por cationes univalentes (Conford, 1964).

Aún no se conoce el mecanismo de acción de esta enzima, si bien se ha podido establecer cuál es la ruta de decarboxilación del Uroporfirinógeno III a Coproporfirinógeno III. De las 24 posibles secuencias a través de 14 intermediarios que podrían formarse por las sucesivas decarboxilaciones de las cuatro cadenas acetato a los correspondientes restos metilo, llevando a cabo la síntesis química de los 14 derivados posibles, procediéndose luego a su decarboxilación enzimática *in vitro* y analizando los productos resultantes, Jackson y col (1976) determinaron cuál era la ruta natural. De acuerdo con sus resultados, el grupo de Jackson ha propuesto que el proceso de decarboxilación enzimática del Urogen III ocurre de modo tal que el sustrato, ubicado en el sitio activo de la enzima, se mueve sobre la superficie de la misma siguiendo el sentido de las agujas del reloj, iniciándose la reacción en el anillo D y continuando luego con los anillos A, B y C para formar el Coproporfirinógeno III (Figura II.8.).

En contraste con esta ruta ordenada para la serie isomérica III, la Decarboxilasa actúa sobre el Urogen I transformándolo en Coprogen I por cualquiera de las dos rutas posibles (Jackson y col, 1977).

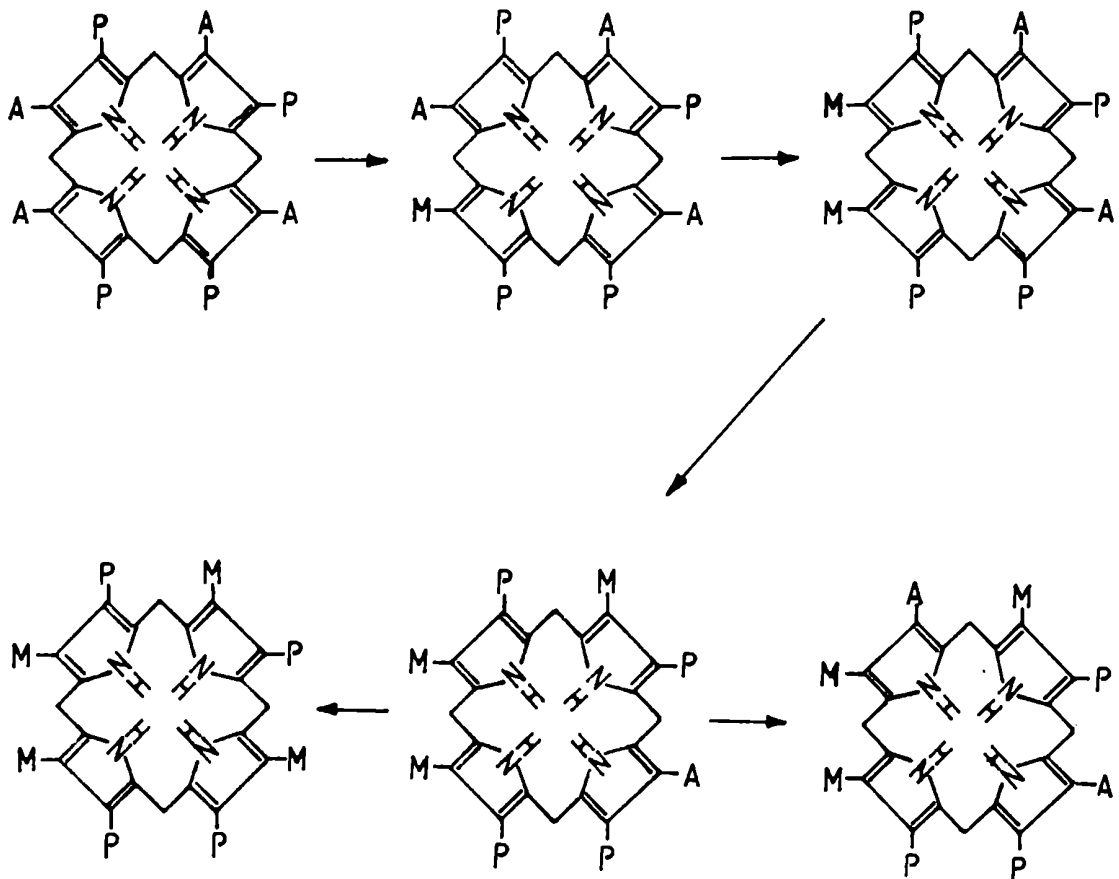


FIGURA II.8.: Ruta normal para la decarboxilación enzimática del Uroporfirinógeno III a Coproporfirinógeno III

II.2.7.1. Decarboxilasa y Porfiria Cutánea Tardía. Modelos experimentales

En las orinas de pacientes con Porfiria Cutánea Tardía (PCT) se encuentran elevadas cantidades de porfirinas con 8, 7, 6, 5 y 4 carboxilos, pero se acumula especialmente Uro y Firiaporfirina. Se postula que este cuadro anormal se debe a una falla en el control del camino de síntesis del hemo y en particular, a una deficiencia de la Decarboxilasa.

Por otra parte, la intoxicación crónica con policlorados, como por ejemplo el hexaclorobenceno, provoca en humanos y en animales un tipo de porfiria con sintomatologías clínicas y bioquímicas similares a las observadas en la PCT. (San Martín de Viale y col. 1970).

Tanto en los casos de PCT como en los modelos experimentales, se postula que el cuadro bioquímico anormal se debe a una deficiencia enzimática primaria a nivel de la Decarboxilasa, que a su vez lleva a un aumento secundario de la actividad de la enzima limitante (ALA-S) por de-represión, todo lo cual conduce al patrón característico de esta porfiria. (Elder y col, 1975 ; San Martín de Viale ,1975 ; Smith y De Matteis ,1980).

II.2.8. Coprogenasa

La formación de Protoporfirinógeno IX a partir de Coproporfirinógeno III está catalizada por la Coproporfirinogenasa (CPG-asa), Coproporfirinógeno-oxidasa o Coprogenasa. Esta reacción implica la decarboxilación oxidativa de los dos restos de ácido propiónico ubicados en las posiciones 2 y 4 de los anillos A y B del Coproporfirinógeno, a dos restos vinilo (Figura II.9.)

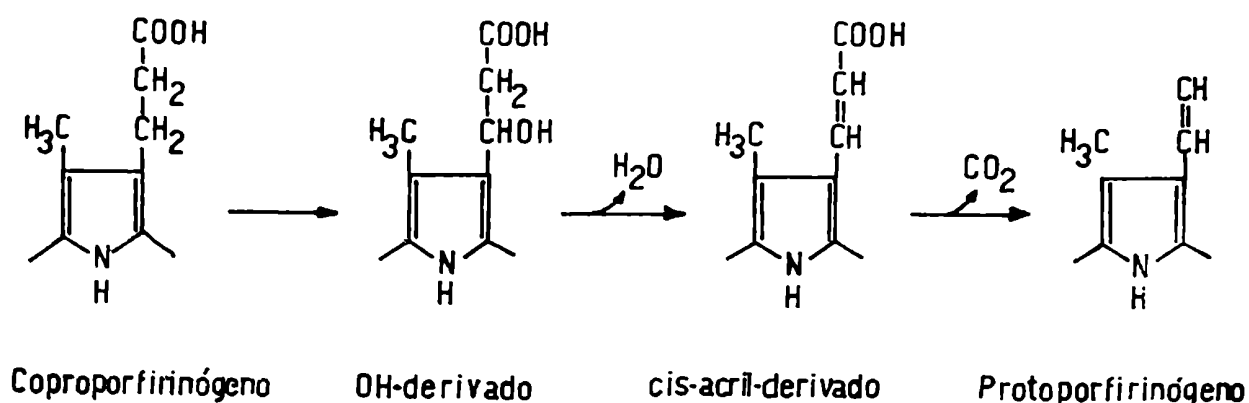


FIGURA II.9.: Mecanismo de decarboxilación oxidativa del Coproporfirinógeno III a Protoporfirinógeno IX.

La enzima es altamente específica para el Coproporfirinógeno III, razón por la cual en la Naturaleza sólo encontramos la Protoporfirina IX. La Coprogenasa no utiliza los Coproporfirinógenos I y II como sustratos, pero *in vitro* puede actuar sobre el isómero IV, que es un producto de síntesis, dando como producto final la Protoporfirina XIII (Al-Hazimi y col, 1976).

En base a la determinación de las estructuras de porfirinas obtenidas de materiales biológicos y a la síntesis química de posibles intermediarios en esta reacción, se han postulado varios mecanismos de acción para esta enzima.

A partir de diversas fuentes naturales y biosintéticas, se ha aislado una porfirina tricarbóxilica, detectada por primera vez en glándula de Harder, por lo cual se la denominó Harderoporfirina (Tomio y Grinstein, 1968); su estructura fue determinada por síntesis química (Kennedy y col, 1970). Este intermediario es un derivado de la Coproporfirina en el cual el resto propiónico de la posición 2 del anillo A está sustituido por un vinilo; esta estructura es idéntica a la porfirina tricarbóxilica aislada de eritrocitos humanos (Eriksen, 1955). Utilizando extractos de *E. gracilis* (Cavaleiro y col, 1973 ; 1974) o hemolizados de eritrocitos de aves (Games y col, 1976), con Hardero o iso-Harderoporfirinógenos sintéticos (en la iso-Hardero el vinilo se halla en la posición 4) se observó incorporación de ambos a la Protoporfirina, aunque con mayor eficiencia para el primero de ellos. Estos resultados han sugerido que la decarboxilación oxidativa de los restos propionato ocurre también en etapas, comenzando por el sustituyente en 2 del anillo A y siguiendo luego por el del anillo B; de esta manera, en analogía con el esquema propuesto para la Decarboxilasa, la Coprogenasa actuaría siguiendo el sentido de las agujas del reloj.

Rimington y Tooth (1961) habían postulado que una acrílico porfirina podría ser un intermediario de la reacción; sin embargo, se observó que el trans 2,4-diacrílico porfirinógeno no actuaba como sustrato (Sano y Granick, 1961; Batlle y Rimington, 1966). Restaba aún la posibilidad de que el verdadero intermediario fuera el isómero cis (Batlle y col, 1965). Más tarde, se aisló de materiales biológicos la Porfirina S-411 (French y col, 1970), en cuya estructura se encuentra un sustituyente cis-acrilato en la posición 2 del anillo, lo cual en cierto modo estaría apoyando la teoría anterior.

En 1965, Batlle y col propusieron que la primera etapa en este proceso era una oxidación del resto propionato a un hidroxipropionato (Figura II.9.). Un año después, Sano (1966) sintetizó una mezcla de isómeros de este compuesto y, utilizando extractos mitocondriales de hígado bovino como fuente de Coprogenasa, comprobó que había un 20% de incorporación en Protoporfirinógeno.

Estudios posteriores *in vitro* (Zaman y col, 1972; Battersby y col, 1972), empleando precursores marcados, revelaron que la Porfirina S-411, aparentemente, no sería un intermediario nor

mal. Así lo interpretaron Jackson y col (1976), quienes sugirieron que el α -OH propionil derivado formado inicialmente podría eliminar H_2O , y decarboxilarse simultáneamente a vinilo. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que, bajo control enzimático, la ruta esquematizada en la Figura II.9. ocurra *in vivo*. Otras investigaciones sobre este tema (Battersby y col, 1975; Zaman y Akhtar, 1976) han contribuido a aclarar algunos aspectos del mecanismo y la estereoquímica de la formación de los grupos vinilo en la Protoporfirina.

En un trabajo reciente (Jackson y col, 1980), en el que se utilizaron hemolizados de eritrocitos de pollo y enzima purificada de hígado de rata como fuente enzimática, se sugirió, en base a los resultados obtenidos, que un porfirinógeno hidroxipropiónico sería el intermediario anterior al Harderoporfirinógeno en la decarboxilación oxidativa del ácido propiónico ubicado en la posición 2 del Coproporfirinógeno, de acuerdo con el esquema de la Figura II.9.

La Coprogenasa es, en la mayor parte de los casos, una enzima mitocondrial (Batlle y col, 1965), tiene en general un requerimiento absoluto por oxígeno molecular (Falk y col, 1953), que actúa como aceptor final de hidrógeno, no pudiendo ser reemplazado por otros oxidantes.

Sin embargo, en ciertos organismos estrictamente anaeróbicos debe existir, necesariamente, algún mecanismo que lleve a la formación de Protogen (Mori y Sano, 1968). Tait (1969, 1972) trabajando con *Rp. spheroides* y Poulson y Polglase (1974 a) con *S. cerevisiae* detectaron actividad de CPG-asa en aerobiosis y en anaerobiosis; en este último caso utilizó, como aceptor de hidrógenos, un sistema constituido por ATP, Mg^{2+} y L-metionina.

Esta enzima se ve afectada en las Coproporfirias hepática y eritropoyética, en las cuales se excretan niveles urinarios significativamente elevados de Coproporfirina. También parece estar inhibida en intoxicación con Pb, junto con el ALA-D, en cuyo caso se encuentra una elevada eliminación de ALA y Coproporfirina en orina. (Kreimer-Birnbaum y Grinstein, 1965; Batlle y col., 1981).

La Coprogenasa ha sido estudiada en muy diversas fuentes, tales como *Chlorella vulgaris* (Granick, 1955), hemolizados de eritrocitos de aves (Dresel y Falk, 1956), *Euglena gracilis* (Granick y Mauzerall, 1958 b), hígado bovino (Sano y Granick, 1961;

Sano , 1958), hígado de buey (Porra y Falk, 1964), hígado de rata (Batlle y col, 1965), *Chromatium D* (Mori y Sano, 1968; Tait, 1972); *Rp. spheroides* (Tait, 1969; 1972); hojas de tabaco (Hsu y Miller, 1970), diversas bacterias (Jacobs y col, 1970), *Saccharomyces cerevisiae* (Poulson y Polglase, 1974 a), linfocitos humanos (Grandchamps y Nordman, 1977) y bazo de rata (Kardish y Woods, 1980).

II.2.9. Protogen oxidasa

La oxidación de protoporfirinógeno a porfirina, uno de los últimos pasos en la síntesis de hemo y clorofila, está catalizada por la Protogen oxidasa.

Esta reacción, que involucra la eliminación de seis hidrógenos del anillo del porfirinógeno, puede ocurrir no enzimáticamente. De todas maneras, estudios recientes han confirmado su naturaleza enzimática en mitocondrias de hígado y de levaduras (Poulson y Polglase, 1975; Poulson, 1976; Jackson y col, 1974). La Protogen oxidasa mitocondrial fue solubilizada, purificada y parcialmente caracterizada (Poulson y Polglase, 1975; Poulson, 1976). Usa oxígeno como único aceptor de hidrógenos y no pudo demostrarse el requerimiento de ningún cofactor para esta reacción directa con oxígeno (Sano y Granick, 1961; Porra y Falk, 1964; Poulson y Polglase, 1975; Poulson, 1976).

En *Escherichia coli*, Jacobs y Jacobs (1975) midieron actividad aeróbica de esta enzima. Estos mismos autores (1976) demostraron luego que esta reacción podía ocurrir anaeróbicamente usando fumarato como aceptor alternativo de electrones. La oxidación anaeróbica del protoporfirinógeno está acoplada a la reducción del fumarato a través de intermediarios de la cadena de transporte de electrones, específicamente quinonas (Jacobs y Jacobs, 1977 a, b; 1978). De aquí puede deducirse que es poco probable un mecanismo de acción enzimático que requiera oxígeno molecular, y que en cambio, la cadena de transporte de electrones debe jugar un rol importante en esta oxidación (Jacobs y Jacobs, 1979).

La Protogen oxidasa es una enzima termolábil, inactivándose a los 40 °C. El Urogen I o III, o Coprogen I o III, no sirven como sustratos. Tiene todas las características de una enzi

ma sulfhidrónica.

Experiencias realizadas en levaduras, indican que la Protogen oxidasa se forma en las mitocondrias y no en el citoplasma, ya que si las células se hacen crecer en presencia de cicloheximida, hay actividad enzimática en la fracción mitocondrial, no así cuando se hacen crecer con cloranfenicol (Poulson y Polglase, 1974 b).

La reacción ocurre en dos etapas. En la primera se forma el intermediario prototetrahidroporfirina IX, un pigmento con un máximo de absorción a 503 nm, comúnmente llamado P503. Este deriva del protoporfirinógeno IX por autooxidación. El segundo paso, que requiere la remoción de 4 H, está catalizado por la Protogen oxidasa (Figura II.10.).

En células reprimidas por glucosa se acumula el pigmento P503 y protoporfirinógeno IX. Esto sugiere que el sitio de represión por glucosa está a nivel de la Protogen oxidasa (Poulson y Polglase, 1974 b).

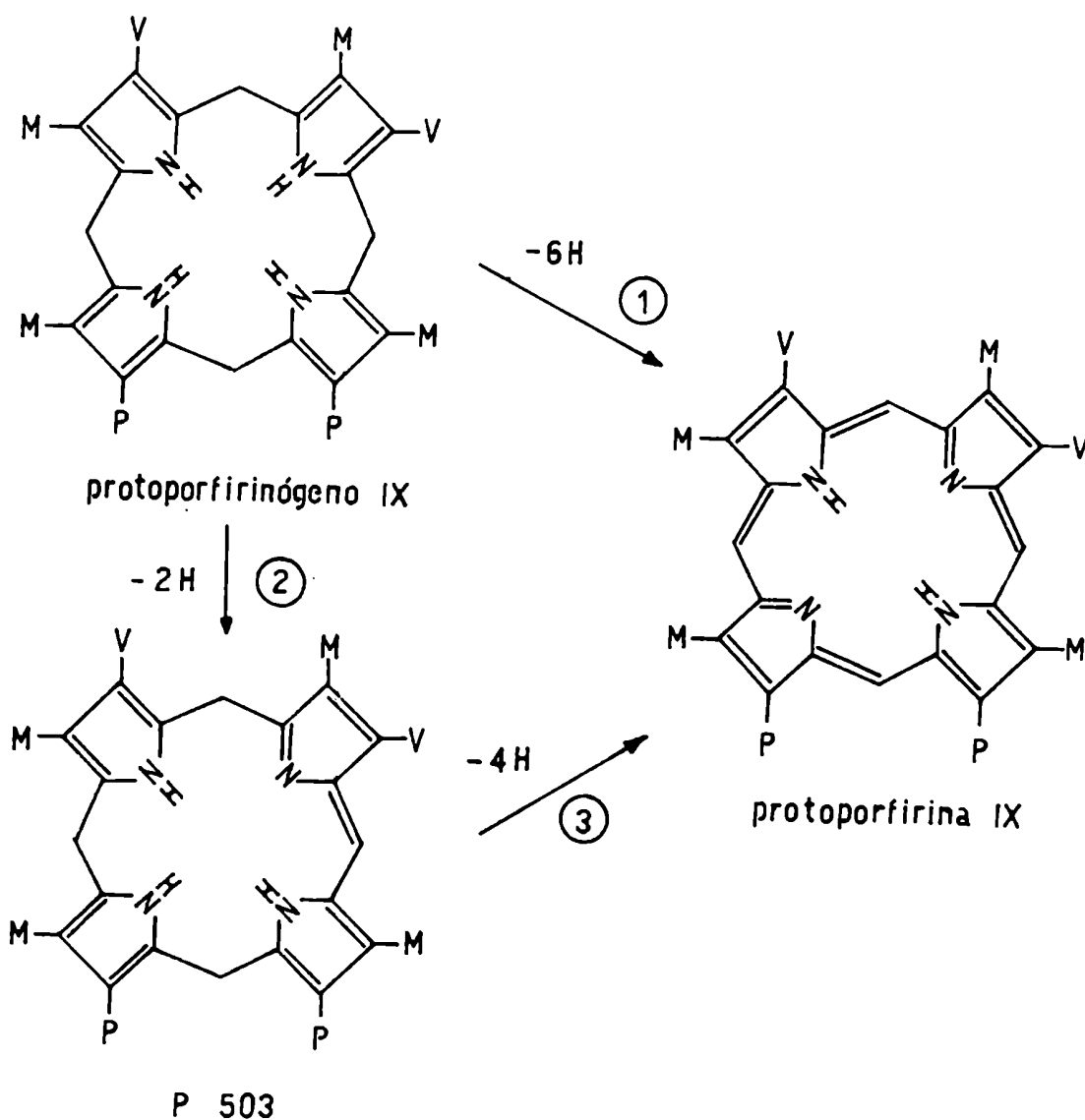
La Protogen oxidasa estaría también involucrada en algunas porfirias. Es posible que se encuentre disminuida en la Porfiria Variegata, en cuyo caso la excreción de Protogen acumulado estaría facilitada por su asociación a péptidos de longitud variable, que constituirían la conocida "fracción de porfirina X", cuya excreción en exceso es una de las características bioquímicas típicas de esta Porfiria. (Batlle y col., 1981).

II.2.10. Ferroquelatasa

La enzima ferroquelatasa (protohemo-ferroliasa) cataliza la inserción de Fe^{2+} en una variedad de porfirinas dicarboxílicas para formar los correspondientes hemos (Labbe y col, 1963); Porra y Jones, 1963, a, b y c).

La presencia de ferroquelatasa ha sido demostrada directamente en preparaciones libres de células de una gran variedad de fuentes, tales como eritrocitos de aves (Krueger y col, 1956), médula ósea (Kasuga y col, 1954), reticulocitos (Clark y Walsh, 1959), hígado, riñón y bazo de mamíferos (Lockhead y Goldberg, 1961), en dos levaduras, *Saccharomyces cerevisiae* (Porra y Jones, 1963, b y c) y *Torulopsis utilis* (Porra y Ross, 1965); en una

gran variedad de bacterias (Porra y Jones, 1963, b y c) y en dos bacterias fotosintéticas, *Chromatium* (Porra y Jones, 1963, b y c) y *Rb. spheroides* (Porra y Lascelles, 1965).



① y ③ Protogen oxidasa

② autooxidación

FIGURA 11.10.: Esquema de la formación de Protoporfirina IX a partir de Protoporfirinógeno IX

También se ha detectado ferroquelatasa en glóbulos rojos de sangre humana patológica: anemias hemolíticas (Grinstein y col, 1959), anemia perniciosa (Lockhead y Goldberg, 1961) y en varios otros desórdenes metabólicos (Vavra y col, 1964).

Posteriormente, la actividad de ferroquelatasa fue demostrada y caracterizada en sangre humana normal (Langelaan y col, 1969). En 1970, estos mismos autores sugirieron que las células de sangre humana podían contener dos enzimas diferentes con actividad de hemosintetasa: una enzima particulada encontrada en leucocitos que era inhibida por éter y una segunda enzima, encontrada en precursores de glóbulos rojos que era altamente estimulada por éter. Esta última parecería ser una lipoproteína, ya que el agregado de ciertos solventes orgánicos o fracciones lipoicas aumentaban su actividad, probablemente facilitando el acceso del sustrato al sitio activo.

La ferroquelatasa es una enzima particulada, localizada en la mitocondria de todos los tipos de células mencionadas (Lockhead y Goldberg, 1961) y también en células de levaduras (Reithmüller y Tuppy, 1964).

La ferroquelatasa de células bacterianas es también particulada y está unida posiblemente a membrana (Porra y Jones, 1963, b y c).

En 1961, Schwartz y col demostraron que la incorporación de Fe^{2+} en la protoporfirina se ve facilitada por la presencia de globina, y que el producto final de la reacción, caracterizado por electroforesis y cromatografía, es la hemoglobina.

Esta enzima es absolutamente específica para el hierro, lo cual es muy significativo, ya que, *in vivo*, la enzima debe seleccionar a este metal entre una posible serie de cationes divalentes. Respecto a su especificidad por la porfirina, se observa que no son esenciales los grupos vinilo ubicados en posición 2 y 4 de la protoporfirina, ya que la meso y deuteroporfirina, en las cuales los vinilos están sustituidos por etilos e hidrógenos, respectivamente, también actúan como buenos sustratos. En cambio, los grupos carboxilo libres del ácido propiónico parecen ser indispensables, ya que cuando están bloqueados, los derivados no son tan efectivos como sustratos (Heikel y col, 1958); tampoco lo son los porfirinógenos ni las porfirinas parcialmente reducidas.

Se ha postulado que la enzima posee dos sitios activos, uno para el metal y otro para la porfirina. (Labbe y Hubbard, 1961).

En la mayoría de los tejidos estudiados, la reacción enzimática tiene lugar en anaerobiosis o en presencia de agentes reductores tales como ácido ascórbico, GSH o CiSH (Porra y Jones, 1963, b; Nishida y Labbe, 1959; Labbe y Hubbard, 1961). Estos resultados estarían sugiriendo la presencia de grupos -SH esenciales.

La enzima obtenida de mitocondrias es inhibida por su sustrato porfirina y retroinhibida por hemo (Iephly y col, 1973), y parece requerir fosfato de piridoxal, que estaría fuertemente unido a la proteína.

Esta enzima se encuentra bloqueada en aquellos casos de porfiria caracterizados por una acumulación de protoporfirina, como la Protoporfirina Eritropoyética. (Batlle y col., 1981).

II.3. Catabolismo del Hemo

Cuando la hemoglobina se destruye en el organismo, su porción proteica, la globina, puede volver a ser utilizada ya sea como tal o bien bajo la forma de los aminoácidos que la constituyen; el hierro entra a formar parte de la reserva de hierro también para su ulterior utilización.

El hemo, en cambio, se degrada en las células reticuloendoteliales del hígado, del bazo y de la médula ósea. El primer paso en la degradación del hemo es la ruptura del anillo de la porfirina entre los núcleos A y B y la eliminación del carbonometilénico α como CO (Figura II.11.). Es probable que el anillo de porfirina pueda abrirse y que aún contenga hierro antes de que se separe la protoporfirina de la globina (Guzelian y Swisher, 1979).

Después de la ruptura del anillo de porfirina del hemo y de la eliminación del hierro, se forma el primero de los pigmentos biliares, la biliverdina IX α , que se reduce fácilmente a bilirrubina y constituye el principal pigmento de la bilis humana.

El sistema enzimático que cataliza estas reacciones está compuesto por dos enzimas: la hemo oxigenasa y la biliverdina re

ductasa (Tenhunen y col, 1969).

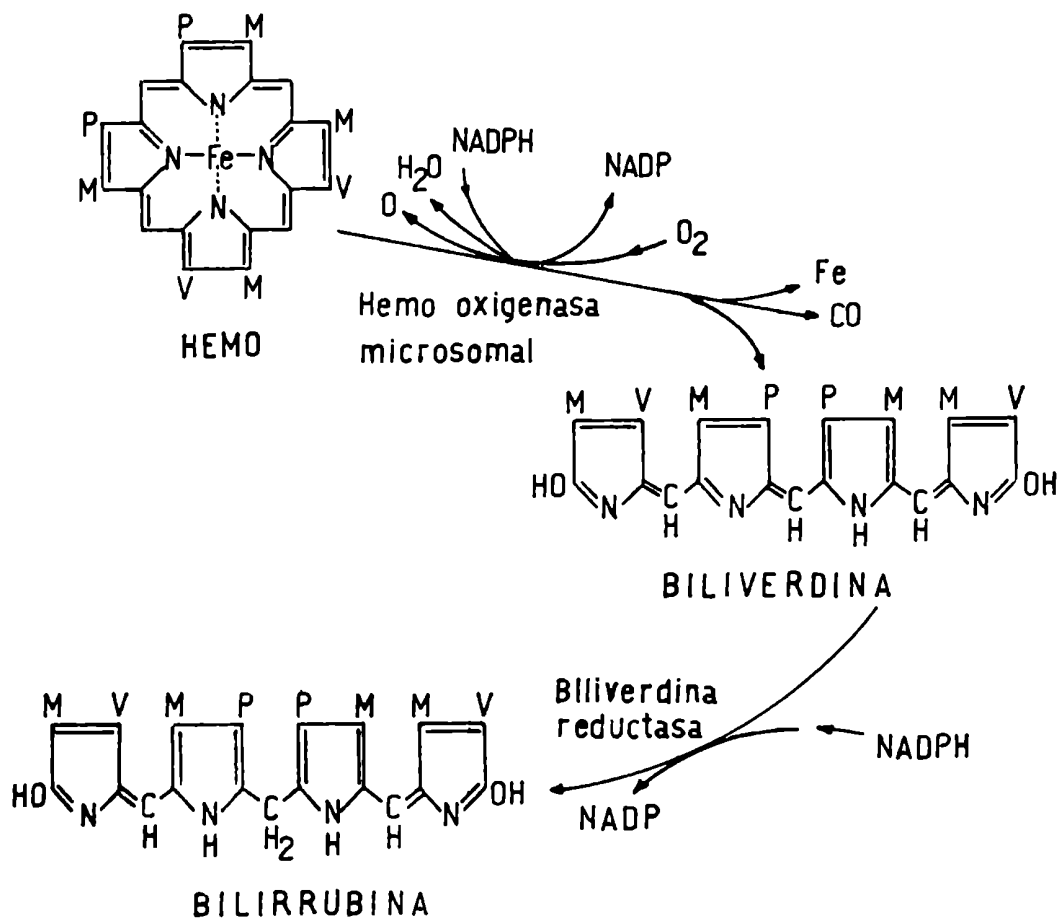


FIGURA II.11.: Catabolismo del hemo

La hemo oxigenasa está localizada en la fracción microsomal del bazo, hígado, médula ósea, macrófagos y otros tejidos involucrados en la degradación de la hemoglobina *in vivo* (Pimstone y col, 1971 a). Cataliza la formación de cantidades equimoleculares de biliverdina IX α y CO, a partir de sustratos que permiten una fácil disociación de la mitad hémica de la porción proteica de la molécula (Tenhunen, 1976). Aunque la mayor actividad enzimática se obtiene con compuestos de protohemina IX, otras heminas de la serie IX, así como otros isómeros (por ejemplo: coproheminina I) tienen una cierta actividad como sustrato. Las porfirinas libres no funcionan como sustrato; de estas experiencias y otras llevadas a cabo con Cu, Co, Ni y paladio porfirinas, surge que el átomo central del hierro es conjuntamente con la parte proteica, indispensable para la actividad enzimática (Tenhunen, 1976).

De manera entonces que, como anticipamos, el producto inicial de la conversión enzimática del hemo a bilirrubina es la biliverdina IX α , que se reduce luego a bilirrubina IX α por acción de la biliverdina reductasa.

La biliverdina reductasa es una enzima soluble, presente en exceso en un gran número de tejidos de mamíferos. Requiere NADPH o NADH como donador de hidrógenos, siendo el primero mucho más efectivo que el segundo a pequeñas concentraciones de biliverdina, y tiene una gran especificidad para biliverdina IX α (Tenhunen y col, 1969).

El sistema enzimático de la hemo oxigenasa tiene un requerimiento absoluto y estequiométrico de oxígeno molecular y NADPH. Se consumen 3 moles de O_2 por mol de bilirrubina formada.

La actividad de la hemo oxigenasa aumenta en hígado, bazo, macrófagos, células de los túbulos renales y otros tejidos, luego de la administración de hemo o hemoglobina, probablemente por inducción por sustrato (Tenhunen, 1976).

Durante el transcurso de la reacción, el hemo se une a una proteína insoluble y sustrato inducible, que se comporta como una oxigenasa estereoespecífica. Esta es una proteína de peso molecular mayor de 200.000 y se localiza dentro de la membrana de retículo endoplásmico (Yoshida y col, 1974).

La relación entre la actividad de esta enzima y el contenido de citocromo P450 sugiere que esta proteína que se une al hemo podría ser también la apoproteína del citocromo P-450 (Tenhunen, 1976).

La actividad de la hemo oxigenasa es mayor en tejidos vinculados con la destrucción de los glóbulos rojos: bazo, hígado, médula ósea y macrófagos (Pimstone y col, 1971 a), pero es baja en riñón, pulmones y otros órganos no involucrados en ese proceso (Pimstone y col, 1971 b).

La hemo oxigenasa es capaz de modificar su actividad, en organismos intactos, según cambios en la disponibilidad de sustrato (Tenhunen y col, 1970). Así, en estados hemolíticos, la actividad de la hemo oxigenasa hepática se incrementa de 3 a 5 veces; por el contrario, en anemia por pérdida de sangre, su actividad no varía. La hemo oxigenasa hepática puede aumentar su actividad luego de esplenectomía, indicando la capacidad poten-

cial del hígado para sustituir al bazo como principal sitio de destrucción de eritrocitos (Ténhunen y col, 1970). Todos estos hechos señalan el importante rol fisiológico que cumple la hemo oxigenasa.

REFERENCIAS

- Al-Hazimi, H.; Jackson, A.H. & Ryder, D. (1976) J. Chem. Soc. Chem. Comm., 188.
- Aragonés, A.; García, R.; San Martín de Viale, L.; Tomio, J.M. & Grinstein, M. (1972) An. Asoc. Qca. Arg. 60, 239.
- Batlle, A.M. del C. (1973) Bioquímica clínica 7, 309.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1962) Biochim. Biophys. Acta 62, 197.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1964) Biochim. Biophys. Acta 82, 1.
- Batlle, A.M. del C.; Benson, A. & Rimington, C. (1965) Biochem. J. 97, 731.
- Batlle, A.M. del C. & Rimington, C. (1966) Ciencia e Investigación 22, 369.
- Batlle, A.M. del C. & Rossetti, M.V. (1977) Int. J. Biochem. 8, 251.
- Battersby, A.R.; Baldas, J.; Collins, J.; Grayson, D.; James, K. & Mc Donald, E. (1972) J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1265.
- Battersby, A.R.; Mc Donald, E.; Wurziger, H.K. & James, K.J. (1975) J. Chem. Soc. Chem. Comm., 493.
- Battersby, A.R.; Mc Donald, E.; Williams, D.C. & Winsiger, M. K.W. (1977 a) J. Chem. Soc. Chem. Comm., 113.
- Battersby, A.R.; Buckley, D.G.; Mc Donald, E. & Williams, D. C. (1977 b) J. Chem. Soc. Chem. Comm., 115.
- Battersby, A.R.; Johnson, D.W.; Mc Donald, E & Williams, D.C. (1977 c) J. Chem. Soc. Chem. Comm., 117.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.I.R.; Matcham, G. & Mc Donald, E. (1980) Nature 17 ;5759.
- Beale, S.I. (1971) Plant Physiol. 48, 316.
- Beale, S.I. & Castelfranco, P.A. (1973) Biochim. Biophys. Res. Commun., 52, 143.
- Beale, S.I. & Castelfranco, P.A. (1974) Plant Physiol. 53, 297.
- Beale, S.I.; Gough, S.P. & Granick, S. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 2714.

- Bloch, K. & Rittenberg, D. (1945) J. Biol. Chem., 159, 45.
- Bogorad, L. (1955 a) Plant Physiol. 30, XLV.
- Bogorad, L. (1955 b) Science, 121, 878.
- Bogorad, L. (1958) J. Biol. Chem. , 233, 516.
- Booy, H. & Rimington, C. (1957) Biochem. J., 65, 4P.
- Brown, E.G. (1958) Biochem. J., 70, 313.
- Burnham, B. & Lascelles, J. (1963) Biochem. J. , 87, 462.
- Burton, G.; Fagenness, P.E.; Mosozawa, S.; Jordan, P. & Scott, I. (1979) J. Chem. Soc. Chem. Comm., 202.
- Carel, E.F. & Kahn, J.S. (1964) Arch. Biochem. Biophys, 108, 1.
- Canivet, C. & Rimington, C. (1953) Biochem. J. 55, 867.
- Cavaleiro, J.; Kenner, G. & Smith, K. (1973) J. Chem. Soc. Chem. Commun, 183.
- Cavaleiro, J.; Kenner, G. & Smith, K. (1974) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1188.
- Clark, R. & Walsh, R.J. (1959) Nature, Lond. 184, 1730.
- Conford, P. (1964) Biochem. J. 91, 64.
- Cha , S. & Park, R. (1964) J. Biol. Chem. 239, 1968.
- Cha , S.; Cha, C. & Parks, R. (1967 a) J. Biol. Chem. 242, 1968
- Cha, S.; Cha, C. & Parks, K.E. (1967 b) J. Biol. Chem. 242, 2582.
- Dresel, E. & Falk, J. (1956) Biochem. J. 63, 80.
- Elder, G. (1982) Abstracts - VIII th. Ietrapyrrole Meeting- Southampton.
- Eriksen, L. (1955) CIBA Foundation Symposium on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism; Ed. G. Westenholme y E. Millar, Churchill, London, p. 154
- Falk, J.E. & Dresel, E.I.B. (1960) Biochim. Biophys. Acta 39, 458.
- Falk, J.; Dresel, E. & Rimington, C. (1953) Nature 172, 292.
- Falk, J.E.; Dresel, E.I.B.; Benson, A. & Knight, B. (1956) Biochem. J. 63, 87.
- French, J.; Nicholson, D. & Rimington, C. (1970) Biochem. J. 120, 393.

- Games, D; Jackson, A.H. & Jackson, J.R. (1976) J. Chem. Soc. Chem. Commun, 187.
- Gassman, M.; Pluscec, J. & Bogorad, L. (1968) Plant Physiol. 43, 1411.
- Gibson, K.; Laver, W. & Neuberger, A. (1958) Biochem. J. 70, 71.
- Gibson, K.D.; Mattew, M.; Neuberger, A. & Tait, G.M. (1961) Nature 192, 204.
- Gibson, J.; Upper, C.D. & Gunsalus, C. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2474.
- Grandchamps, B. & Nordman, Y. (1977) Biochim. Biophys. Res. Commun. 74, 1029.
- Granick, S. (1955) CIBA Foundation Symposium on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism. Ed. G. Wolstenholme y Miller, E. C. P. London, p.143.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958 a) J. Biol. Chem. 232, 1119.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958 b) Feder. Proc. 17, 233.
- Granick, S. & Urata, G. (1963) J. Biol. Chem. 238, 821.
- Grinstein, M.; Schwartz, S. & Watson, C. J. (1945) J. Biol. Chem. 157, .323.
- Grinstein, M.; Bannerman, R.M. & Moore, C.V. (1959) Blood, 14, 476.
- Guzelian, P. & Swisher, R. (1979) Biochem. J. 184, 481
- Hacer, L.P. (1957) J. Am. Chem. Soc. 79, 4864.
- Hayashi, N.; Yoda, B. & Kikuchi, G. (1969) Archs. Biochem. Biochpys. 131, 83.
- Hayashi, N.; Yoda, B. & Kikuchi, G. (1970) J. Biochem. Tokyo 67, 859.
- Heikel, T.; Lockwood, W. & Rimington, C. (1958) Nature, London 182, 313.
- Hoare, D.S. & Heath, H. (1958 a) Nature 181, 1592.
- Hoare, D.S. & Heath, H. (1958 b) Biochem. J. 69, 51.
- Hoare, D.S. & Heath, H. (1959) Biochem. J. 73, 679.
- Hsu, W. & Miller, G. (1970) Biochem. J. 117, 215.

- Jackson, A.H.; Games, D.E.; Couch, P.; Jackson, J.R.; Belcher, R.E. & Smith, S. (1974) *Enzyme* 17, 81.
- Jackson, A.H.; Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Evans, N.; Games, D.E.; Matlin, S.A.; Eider, G.H. & Smith, S.G. (1976) *Phil. Trans. R. Soc. London* 273, 191.
- Jackson, A.H.; Nagaraja Rao, K.R.; Supphayen, D.M. & Smith, S.G. (1977) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 696.
- Jackson, A.H.; Jones, D.M.; Philip, G.; Lash, T.D.; Batlle, A.M. del C. & Smith, S.G. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 681.
- Jacobs, N.; Jacobs, J. & Brent, P. (1970) *J. Bacteriol.* 102, 398.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 435.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449, 1.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1977 a) *Biochim. Biophys. Acta* 459, 141.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1977 b) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 78, 429.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 544, 540.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 396.
- Jordan, P. & Sehra, J.S. (1979) *FEBS Letters* 104 (2), 364.
- Jordan, P.; Burton, G.; Nordlov, H.; Scheneider, M.; Pryde, L. & Scott, I. (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 204.
- Kardich, R.M. & Woods, J.S. (1980) *J. Appl. Biochem.* 2, 168.
- Kasuga, S.; Konno, K. & Sakai, Y. (1954) *J. Jap. Biochem. Soc.* 26, 282.
- Kaufman, S. (1951) *En"Phosphorus metabolism"* vol 1, p. 370. Ed. Mc Elvery, W. Glass Baltimore, U.S.A.
- Kaufman, S.; Gelbarg, G.; Cori, U.; Uchoa, S. (1950) *J. Biol. Chem.* 203, 869.
- Kaufman, S. & Alivisatos, S.G. (1955) *J. Biol. Chem.* 216, 141.

- Kennedy, G.; Jackson, A.H.; Kenner, G. & Suckling, G. (1970) FEBS Letters 6, 9.
- Kikuchi, G.; Shemin, D. & Badman, B. (1958 a) Biochim. Biophys. Acta 28, 219.
- Kikuchi, G.; Kumar, A.; Ialmage, P. & Shemin, D. (1958 b) J. Biol. Chem. 233, 1214.
- Kikuchi, G.; Kumar, A. & Shemin, D. (1959) Fedn. Proc. 18, 259.
- Kohn, M. (1951) "Phosphorus Metabolism" eds. Mc Elroy y B. Glass, 1, 374.
- Kreil, G. & Boyer, P. (1964) Biochem. Biophys. Res. Commun. 6, 551.
- Krueger, R.G., Melnick, I. & Klein, J.R. (1956) Arch. Biochem. Biophys. 64, 302.
- Kushner, J.P.; Steinmuller, D.P. & Lee, G.R. (1975) J. Clin. Invest. 56, 661.
- Labbe, R. & Hubbard, N. (1961) Fedn. Proc. 20, 376.
- Labbe, R.F.; Hubbard, N. & Caughey, W.S. (1963) Biochemistry 2, 372.
- Langelaan, D.E.; Losowsky, M.S. & Toothill, C. (1969) Biochem. J. 101, 17 P.
- Lascelles, J. (1956) Biochem. J. 62, 18.
- Lascelles, J. (1957) Biochem. J. 66, 65.
- Laver, W.G; Neuberger, A. & Underfriend, S. (1958) Biochem. J. 70, 4.
- Lockhead, A. C. & Goldberg, A. (1961) Biochem. J. 78, 146.
- Lohr, J.B. & Friedmann, H.C. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 908.
- Llambías, E. & Batlle, A.M. del C. (1970 a) Biochim. Biophys. Acta 220, 552.
- Llambías, E. & Batlle, A.M. del C. (1970 b) FEBS Letters 9, 180.
- Llambías, E. & Batlle, A.M. del C. (1970 c) FEBS Letters 6, 285.
- Llambías, E. & Batlle, A.M. del C. (1971 a) Biochem. J. 121, 327.
- Llambías, E. & Batlle, A.M. del C. (1971 b) Biochim. Biophys. Acta 227, 180.

- Llambías, E.B.C.; Locascio, G. & Batlle, A.M. del C. (1971) Anal. As. Q. Arg. 59, 271.
- Marver, H.S.; Tschudy, D.P.; Perlroth, D.P. & Rechcigl, M. (1966) J. Biol. Chem. 241, 4323.
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1141.
- Miller, J.W. & Teng, D. (1967) Proc. 7th. Intern. Congr. Biochemistry, Tokyo. p. 1059.
- Mori, M. & Sano, S. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 610.
- Moyer, R.A.; Ramaley, R.F.; Butler, L. & Bayer, P. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4299.
- Muir, H. & Neuberger, A. (1949) Biochem. J. 45, 163.
- Muir, H.M. & Neuberger, A. (1950) Biochem. J. 47, 97.
- Nandi, D. & Waygood, E. (1965) Can. J. Biochem. 43, 1605.
- Nandi, D.J. & Shemin, D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 1236.
- Nemeth, A.M.; Russell, C.S. & Shemin, D.J. (1958) J. Biol. Chem. 229, 415.
- Neuberger, A. & Turner, J.M. (1963) Biochim. Biophys. Acta 67, 342.
- Nishida, G. & Labbe, R. (1959) Biochim. Biophys. Acta 31, 511.
- Nishimura, J.S. (1967) Biochemistry 6, 1094.
- Nishimura, J.S. & Grinnel, F. (1972) En "Advances in Enzymology" (Ed. Meister) Vol. 36, 183. Wiley & Son. Chicester.
- Noguchi, T. & Mori, R. (1981) J. Biol. Chem., 10335.
- Pearson, P. & Bridger, W. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8524.
- Pimstone, N.R.; Tenhunen, R.; Seitz, P.T.; Marver, H.S. & Schmid, R. (1971 a) J. Exp. Med. 133, 1264.
- Pimstone, N.R.; Engel, P.; Tenhunen, R.; Seitz, P.T.; Marver, H.S. & Schmid, R. (1971 b) J. Clin. Invest. 50, 2042.
- Porra, R.J. & Falk, J.G. (1964) Biochem. J. 90, 69.
- Porra, R. & Irving, E. (1970) Biochem. J. 116, 42 P.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963 a) Biochem. J. 87, 181.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963 b) Biochem. J. 87, 186.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963 c) Proc. 9th. Congr. Europ. Soc. Haemat. Lisboa Vol 2, p.611. Ed. by Lüdin, H. Basel, N. York, S. Karger.

- Porra, R.J. & Lascelles, J. (1965) *Biochem. J.* 94, 120.
- Porra, R.J. & Ross, P.D. (1965) *Biochem. J.* 94, 557.
- Poulson, R. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 3730.
- Poulson, R. & Polglase, W.J. (1974 a) *J. Biol. Chem.* 249, 6367.
- Poulson, R. & Polglase, J. (1974 b) *FEBS Letters* 40, 258.
- Poulson, R. & Polglase, J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 1269.
- Ra Maley, R.F.; Bridger, W.A.; Mayer, R.W. & Boyer, P. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 4287.
- Radin, N.S.; Rittenberg, D. & Shemin, D. (1950) *J. Biol. Chem.* 184, 745.
- Reithmüller, G. & Tuppy, H. (1964) *Biochem. Z.* 340.
- Rimington, C. & Tooth, B. (1961) *J. Biochem. Tokyo*, 49, 456.
- Romeo, G. & Levin, E. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 230, 330.
- Rossetti, M.V. (1978) Tesis de Doctorado en Cs. Químicas (UBA).
- Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 277.
- Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 781.
- Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A.; Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 761.
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969) *FEBS Letters*, 3, 223.
- Sano, S. (1958) *Acta Haematol. Japan* 21, 237.
- Sano, S. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 5276.
- Sano, S. & Granick, S. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1173.
- San Martín de Viale, L.C. & Grinstein, M. (1968) *Biochim. Biophys. Acta*, 158, 79.
- Schwartz, H.C.; Goldsmith, R.; Hill, R.L.; Cartwright, G.E. & Wintrobe, M. M. (1961) *J. Clin. Invest.* 40, 188.
- Shemin, D. (1955) in *CIBA Foundation Symposium on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism* (ed. by G.W. Woltenholme) p. 423, Churchill, London.

- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1945) J. Biol. Chem. 159, 567.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1946) J. Biol. Chem. 166, 627.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1951) J. Biol. Chem. 192, 315.
- Shemin, D.; Russell, C.S. & Abramsky, T. (1955) J. Biol. Chem. 215, 613.
- Shemin, D. & Wittenberg, J. (1951) J. Biol. Chem. 192, 315.
- Shigesada, K. (1972) J. Biochem. Tokyo 71, 961.
- Tait, G. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 116.
- Tait, G. (1972) Biochem. J. 128, 1159.
- Teherani, J. & Nishimura, J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 3883.
- Tenhunen, R. (1976) Annals Clin. Res. 8, 2.
- Tenhunen, R.; Marver, H.S. & Schmid, R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 6388.
- Tenhunen, R.; Marver, H.S. & Schmid, R. (1970) J. Lab. Clin. Med. 75, 410.
- Tephly, T.; Webb, C.; Trussler, P.; Kniffer, F. & Marjer (1973) Drug Metabolism 1, 259.
- Tomio, J.M.; Garcia, R.C.; San Martín de Viale, L.C. & Grinstein, M. (1970) Biochim. Biophys. Acta, 198, 353.
- Tomio, J. & Grinstein, M. (1968) Eur. J. Biochem. 6, 80.
- Varticovski, L.; Kushner, J.P. & Burnham, B.F. (1980) Int. J. Biochem. 12, 739.
- Vavra, J.D.; Mayer, V.K. & Moore, C.V. (1964) J. Lab. Clin. Med. 63, 736.
- Viale, A.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 729.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1973) Enzyme 16, 128.
- Wider de Xifra, E. & Batlle, A.M. del C. (1976) " Porphyrins in Human Diseases", p. 25. Ed. M. Doss y M. Lahn.
- Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A.M. del C. & Tigier, H. (1971) Biochim. Biophys. Acta 235, 511.
- Wider de Xifra, E.A.; Mendiara, S. & Batlle, A.M. del C. (1972) FEBS Letters, 27, 275.

- Wider de Xifra, E.A. & Tigier, H (1971) *Enzymologia* 41, 217.
- Wittenberg, J. & Shemin, D. (1949) *J. Biol. Chem.* 178, 47.
- Yoshida, T.; Takahashi, S. & Kikuchi, G. (1974) *J. Biochem.* 75, 1187.
- Zaman, S.; Ablond, M. & Akhtar, M. (1972) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1263.
- Zaman, Z. & Akhtar, M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 61, 215.
- Elder, G.H. & Tobei, (1977) *Biochem. J.* 5, 1470.
- Elder, G.H ; Evens, J.O. & Matlin, S (1975) *1st Int. Porphyrin Meeting, Freiburg*, p. 424
- San Martin de Viale, L.; Viale, A.A.; Nacht, S. y Grinstein, M. (1970) *Clin. Chim. Acta* 28, 13.
- San Martin de Viale, L.; Ríos de Molina, M. del C.; Wainstok, R. & Tomio, M.J. (1975) *1st Int. Porphyrin Meeting, Freiburg*, p. 445.
- Battle, A.M. del C.; Meghin, P.H. & Wider, E.A. (1981) En "Porfirinas y Porfirros. Etiopatogenia, clinica y tratamiento". EUDEBA. (Bs.As.)
- Kreimer-Birnbaum, M. y Grinstein, M. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 111, 110.

ALA-DEHIDRASA

III.1. Función del ALA-Dehidrasa en el camino biosintético del Hemo	66
III.2. Historia	67
III.3. Estructura y peso molecular	68
III.4. Mecanismo de acción	69
III.5. Activación e inhibición del ALA-D	73
III.5.1. Activación	73
III.5.2. Coenzimas	74
III.5.3. Metales alcalinos	75
III.5.4. Metales alcalino térreos	75
III.5.5. Buffers	77
III.5.6. Acido δ -Aminolevúlico	78
III.5.7. Sustancias inductoras de porfiria y anemia	78
III.5.8. Activadores tiólicos	79
III.6. Inhibición	80
III.6.1. Reactivos sulfhidrúlicos específicos	80
III.6.2. Reactivos quelantes de metales	83
III.6.3. Sulfitos	84
III.6.4. Inhibidores específicos	85
III.6.4.1. Aminocetoácidos	85
III.6.4.2. Hemo y compuestos hémicos	86
III.6.4.3. Protoporfirina y Coproporfirina	87
III.6.4.4. Urea y Derivados	88
III.6.4.5. Fosfato de Piridoxal, Fosfatos de alta energía e inhibidores endógenos	88
III.7. Significado biológico y bioquímico	89
III.7.1. Ontogénesis y actividad enzimática	89
III.7.2. Aspectos genéticos	90
III.7.3. Influencia sobre la síntesis de enzima	92
III.7.4. Degradación enzimática	92
III.7.5. Funciones limitantes y regulatorias	93
III.7.6. Camino metabólico del δ -ALA	95
III.7.7. Mecanismos de retroinhibición	96

III.7.8.	Potencial rédox celular	97
III.8.	Importancia clínica	97
III.8.1.	Método de ensayo enzimático	98
III.8.2.	Enfermedades hepáticas	100
III.8.3.	Tirosinemia	100
III.8.4.	Enfermedades renales	100
III.8.5.	Tumores	101
III.8.6.	Alcohol	102
III.8.7.	Porfirias	102
III.8.8.	Anemia	103
III.9.	Factores ambientales: Metales	106
III.9.1.	Cadmio	106
III.9.2.	Mercurio	108
III.9.3.	Plomo	108
	Referencias	109

III. ALA-DEHIDRASA

III.1. Función del ALA-Dehidrasa en el camino biosintético del Hemo

De las enzimas que participan en la síntesis del hemo consideraremos ahora en particular, ya que es objeto de estudios en el presente trabajo, a la δ -Aminolevúlico-Dehidrasa (ALA-D), también conocida como Porfobilinógeno Sintetasa. El ALA-D cataliza la ciclación de 2 moléculas del compuesto alifático ácido δ -aminolevúlico (ALA) para dar un derivado heterocíclico, el porfobilinógeno (PBG). En este proceso se pierden dos moléculas de agua. Esta descripción simplificada del mecanismo de acción justifica el nombre de la enzima.

En la Nomenclatura de Enzimas de 1964 de la "International Union of Biochemistry", la enzima se clasificó como "5-aminolevulinato-hidro-liasa (agregando 5-aminolevulinato y ciclando)", bajo el número de código E.C. 4.2.1.24. Esto indica que el ALA-D pertenece a la cuarta clase principal, las liasas, que son capaces de eliminar pequeños grupos del sustrato por una ruta no hidrolítica, catalizando la formación de un doble enlace. El ALA-D pertenece a la segunda subclase, las carbono-oxígeno liasas, que son mayormente hidroliasas, indicando el prefijo "hidro" el tipo de reacción.

El ALA-D es una enzima citoplasmática soluble, o sea que no está unida a mitocondrias u otras organelas (Granick y Mauzerall, 1958). Tiene un peso molecular de 280.000; y las características de una enzima sulfhidrónica: su actividad se ve inhibida por metales pesados y otros inhibidores tiólicos (Burnham y Lascelles, 1963; Gibson y col, 1955). El pH óptimo varía de acuerdo con el origen de la enzima, dentro de amplios márgenes, entre 6,3 (Granick y Mauzerall, 1958) y 9,5 (Barreiro, 1967). La máxima actividad enzimática se presenta, *in vitro*, a temperaturas de 55 °C (Tigier y col, 1968, 1970) a 65 °C (Batlle y col, 1967). Se encontraron diferentes valores de la constante de Michaelis-Menten (K_m) entre el rango de $7,7 \times 10^{-5}$ y $1,0 \times 10^{-3}$ moles/litro (Nandi y Waygood, 1967). El ácido δ -aminolevúlico es el sustrato del ALA-D.

La bioquímica del ALA-D presenta aspectos interesantes ya

que cataliza una reacción poco común en la cual están involucradas dos moléculas de sustrato idénticas; y además porque lleva a la formación del primer compuesto cíclico, y único monopirrol natural de la cadena biosintética del hemo.

III.2. Historia

Por regla general, se afirma que las macromoléculas de las células vivas se sintetizan a partir de moléculas relativamente simples, de amplia ubicuidad. Esto se aplica también a la síntesis del hemo, como fuera demostrado a fines de la década del cuarenta por el grupo de Shemin (1945). Recordemos que utilizando eritrocitos de ave y sustratos marcados se probó que el primer paso de la síntesis del hemo involucra la condensación de glicina y succinil-CoA para formar ALA. Luego de que Westall, en 1952, logró aislar PBG de la orina de pacientes con porfiria aguda, lo cual había sido descrito por primera vez en 1934 por Waldenström, aumentó el interés en cuanto al rol que juega este compuesto en la biosíntesis del hemo.

En los años subsiguientes, se determinó la estructura del PBG como la de un monopirrol (Cookson y Rimington, 1953), y sobre la base de numerosos estudios *in vitro*, fue reconocido como precursor de las porfirinas (Bogorad y Granick, 1953; Falk y col, 1953). Permanecía todavía sin aclarar la conversión enzimática del δ -ALA a PBG.

Utilizando hemolizados de eritrocitos de pollo, Dresel y Falk (1953) y Granick un año después (1954), postularon la existencia de una enzima que catalizaría la conversión de ALA a PBG.

Gibson, Neuberger y Scott, en 1955, y Granick y Mauzerall, en 1958, demostraron la existencia de la enzima y describieron sus características más importantes. Estos trabajos sirvieron de guía para numerosos estudios posteriores.

El ALA-D, como fuera designada desde entonces, está ampliamente distribuida en la naturaleza: en células parenquimales y sanguíneas de las más diversas especies animales (Barreiro, 1969; Batlle y col, 1967; Coleman, 1966; Onisawa y Labbe, 1962; Shetty y Miller, 1969; Tancioni y col, 1964; Tomio y col, 1968; Granick, 1954; Granick y Mauzerall, 1958; Moore y col, 1971) y

en el hombre (Calissano y col, 1966; Collier, 1971; Nakao y col, 1968); en células de trigo (Nandi y Waygood, 1967); tabaco (Shetty y Milier, 1969) y otras plantas (Carell y Kahn, 1964; Steer y Gibbs, 1969; Stobart y Thomas, 1968; Tigier y col, 1968; 1970); en células de levaduras (Barreiro, 1967; 1969), en hongos (Komai y Neilands, 1968, 1969; Muthukrishnan y col, 1972) y bacterias (Ho y Lascelles, 1971; Menon y Shemin, 1967; Yamasaki y Moriyama, 1971), entre las cuales, las *Rhodopseudomonas (Rp) spheroides* juegan un papel particularmente importante en estas investigaciones (Burnham y Lascelles, 1963; Heyningen y Shemin, 1970, 1971 a; Nandi, 1971; Nandi y col, 1968; Nandi y Shemin, 1968 a y b):

Se han llevado a cabo numerosos estudios con el objeto de establecer una conexión entre las variaciones de actividad de esta enzima y enfermedades de los animales y el hombre, así como en defectos genéticos de la síntesis de porfirinas. Discutiremos más adelante los resultados de estos trabajos.

III.3. Estructura y peso molecular

El peso molecular de la enzima, determinado por varios métodos, resultó ser del orden de 280.000 para la mayoría de las fuentes.

Por electroforesis en gel de poliacrilamida, de una preparación purificada en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol, el ALA-D corrió con una movilidad correspondiente a la de una proteína de 35.000 de peso molecular. Se ha postulado que ésta sería la subunidad mínima que compone el octámero de 280.000 D. Esta conclusión es consistente con los estudios combinados de microscopía electrónica y determinaciones de pesos moleculares, realizados por Wu y col (1974).

Las partículas observadas parecen consistir en cuatro lóbulos colocados en las cuatro esquinas de un cuadrado. Como son ocho las subunidades, estos cuatro lóbulos se agrupan con otros cuatro dirigiéndose cada uno hacia los vértices de un cubo (Figura III.1.).

La estructura funcional mínima en el ALA-D bovina, y posiblemente en todas las ALA-D, es un dímero, constituido por dos subunidades que si bien pueden tener similar composición, juegan

un papel diferente en la síntesis del monopirrol ^oPBG a partir de dos moléculas de ALA.

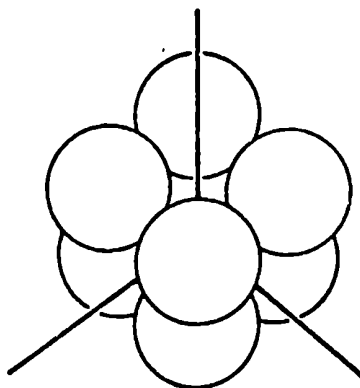


FIGURA III.1.: Modelo de la estructura cuaternaria del ALA-D

En 1968, Nandi y Shemin, estudiando la cinética de formación de PBG catalizada por el ALA-D en *Rp. spheroides*, observaron que el ALA poseía efectos homotrópicos cooperativos, obteniéndose una curva sigmoidea cuando se graficaba actividad enzimática versus concentración de sustrato. Los cationes monovalentes como K, Li, Rb o NH₄, ejercían efectos heterotrópicos cooperativos, produciendo al mismo tiempo curvas de saturación hiperbólicas.

El K produce cambios conformacionales en la enzima y/o promueve la transición de un estado de la proteína menos reactivo a uno más activo.

III.4. Mecanismo de acción

La enzima, formada por ocho subunidades, forma bases de Schiff con el sustrato, y se ha demostrado que sólo cuatro de las ocho subunidades reaccionan con el ALA (Shemin, 1976).

El grupo amino involucrado en la formación de la base de Schiff ha sido identificado como un residuo específico de lisina, que además se encuentra en el sitio activo.

Nandi y Shemin (1968 b) han comprobado que existen otros residuos que aportan una carga positiva de la que depende la actividad enzimática.

Tsukamoto y col (1975) han demostrado que uno o dos residuos de histidina serían esenciales en la funcionalidad del ALA-D.

La enzima se inactiva por foto-oxidación y existen evidencias acerca de la destrucción de un residuo de histidina, por posterior análisis de aminoácidos de la enzima fotoinactivada.

En la composición de aminoácidos (Tsukamoto y col, 1975) se sabe que hay nueve tirosinas, cuatro triptofanos y seis residuos de metionina por subunidad; estos aminoácidos no están en el centro activo de la enzima. Es posible que el péptido que contiene el residuo activo de lisina tenga un entorno hidrofóbico (Batlle y Stella, 1978). Esto está de acuerdo con el hecho de que en la mayoría de los casos la reactividad de las lisinas que forman bases de Schiff es debida a su localización en una región hidrofóbica de la proteína que tiende a estabilizar la base de Schiff y los carbaniones intermedios.

Consecuentemente, la transferencia de protones desde un medio acuoso al sitio activo hidrofóbico puede mediarse por residuos de histidinas situadas en regiones lipofílicas de la enzima.

Cada sitio catalítico podría funcionar, de algún modo, independientemente de los otros (Batlle y col; 1978); así, se ha postulado que la estructura mínima necesaria para la actividad, es un dímero funcional formado por dos clases de subunidades que, posiblemente, tienen la misma composición pero juegan un papel diferente en la síntesis de PBG.

El esquema de la Figura III.2, muestra el mecanismo de acción propuesto para la enzima.

Se propuso que la subunidad I puede formar una base de Schiff con una molécula de ALA (I) mientras que la subunidad II se une a la otra molécula de ALA (II), mediante un enlace covalente.

Los contactos entre las subunidades, sitios A y B, pueden ser de diferentes tipos: interacciones iónicas o puentes de hidrógeno entre tirosina y triptofano o grupos -SH; también pueden

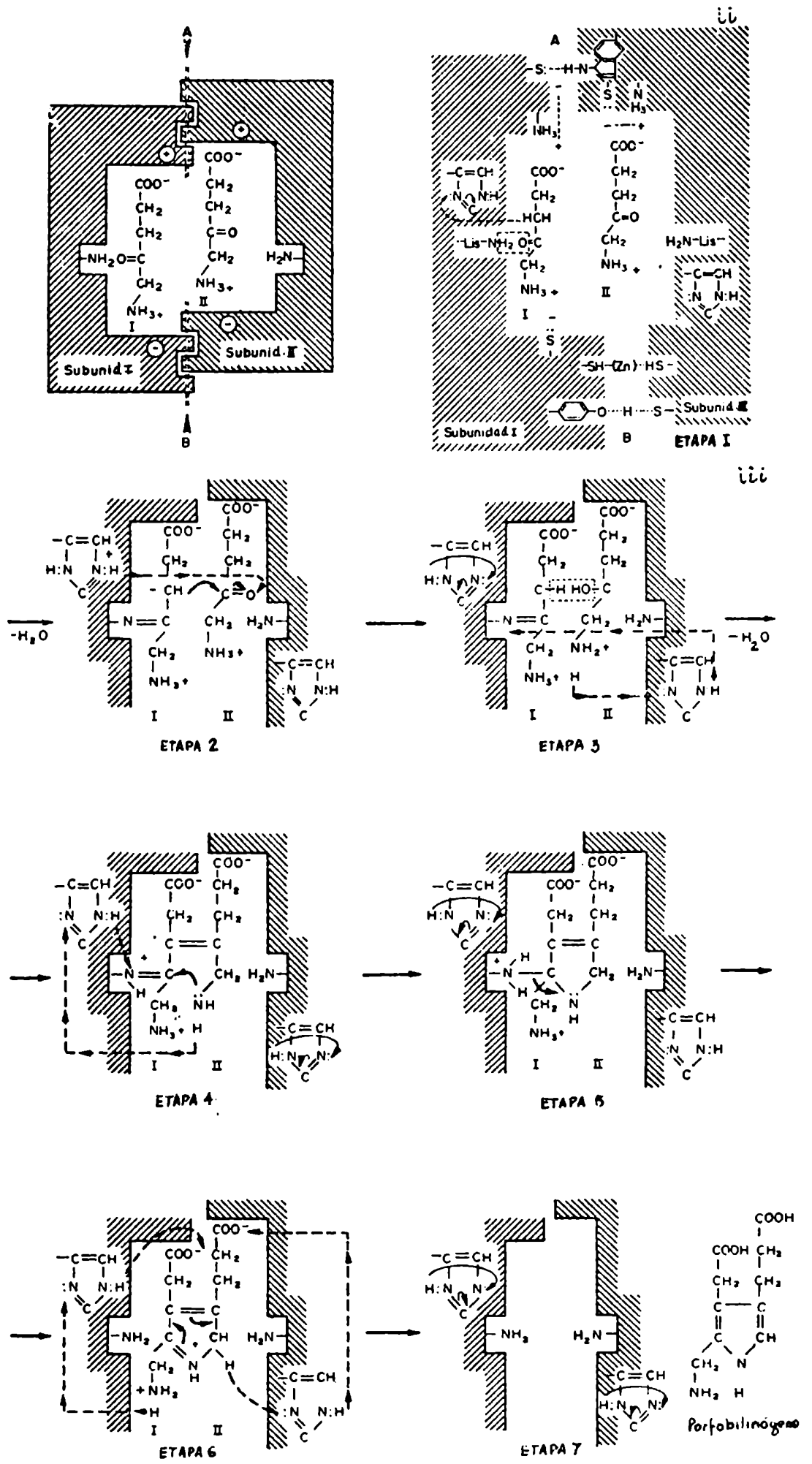


FIGURA III.2.: Mecanismo de acción propuesto para el ALA-D

formarse enlaces covalentes entre los grupos -SH y el metal activador Zn. La posibilidad de otro tipo de interacciones como son las hidrofóbicas, no puede excluirse.

En la primera etapa tendríamos el complejo integrado por las dos moléculas de ALA y las dos subunidades enzimáticas. Como propusieron Nandi y Shemin (1968 b), se formaría una base de Schiff entre el grupo carbonilo de la molécula de ALA (I) y un residuo de lisina de la subunidad I; esta unión está facilitada por la proximidad de la histidina que transporta un protón desde el carbono β del sustrato al centro hidrofóbico, estabilizando así el carbanión resultante y la base de Schiff.

En la etapa inicial se producen interacciones entre el carboxilo y el amino terminales de las dos moléculas de sustrato y dos residuos, positivo y negativo, de la enzima. Los grupos cargados positivamente pueden ser otros restos lisina ya que hay doce de estos residuos por subunidad; si los -SH están cerca de los residuos de lisina, sus propiedades básicas se incrementan fuertemente por migración de protones desde los primeros a los segundos.

En la segunda etapa, el carbanión estabilizado efectuaría un ataque nucleofílico sobre un grupo γ -carbonilo de la molécula de ALA (II) y el residuo de histidina de la subunidad I de la enzima transferiría un protón al oxígeno del mismo grupo, después se produciría una condensación aldólica, mientras que la histidina de la subunidad I sufre un reordenamiento electrónico adoptando su estructura inicial y el residuo de histidina de la subunidad II transferiría un protón desde el grupo δ -amino de la molécula de ALA (II) al ϵ -amino del resto de lisina que forma la base de Schiff, con la molécula de ALA (I).

En la etapa cuarta tiene lugar otro transporte de un protón del mismo δ -amino del ALA (II) al ϵ -amino de la lisina de la subunidad I mientras que la histidina de la subunidad II recobra su estructura inicial y está preparada para captar y desprender protones nuevamente.

En la quinta etapa tiene lugar un tipo de transaminación cuyo resultado es la separación del producto PPS de su unión covalente con la enzima.

Un reordenamiento final (sexta etapa) en el cual los dos

restos histidina de ambas subunidades participarían en un transporte de protones, conducirían a la formación de un sistema conjugado, no polarizado, incapaz de reaccionar con la enzima, lo cual permite liberar completamente el pirró1 del sitio activo del ALA-D, regenerándose la enzima libre que puede así entrar en otro ciclo de reacciones.

El grado de afinidad de la enzima por el δ -ALA y otros γ -cetoácidos relacionados, depende obviamente de la facilidad para formar una base de Schiff y un enlace entre un grupo de la enzima cargado positivamente y el ion carboxilo del sustrato en posición β al grupo carbonilo (Nandi y Shemin, 1968 b). Para esta unión con la enzima, el sustrato requiere un grupo carboxilo libre, como se confirmó utilizando ALA-metil éster como sustrato, y un grupo carbonilo en posición γ a un grupo carboxilo ionizado; ésto fue sugerido por Granick y Mauzerall (1958) en base a estudios de inhibición. La existencia de un grupo cargado positivamente en una posición determinada de la proteína enzimática, probablemente juegue un rol importante en la orientación del sustrato en la enzima, de manera que se forme sólo PBG y no otros pirroles (Nandi y Shemin, 1968 b).

Más recientemente, Jordan y Seehra (1980) utilizando técnicas de espectroscopía RMN con ^{13}C , propusieron un mecanismo de acción en el cual la primera molécula de ALA que se une al sustrato es la que va a dar lugar al ácido propiónico del PBG, con una afinidad al menos un orden de magnitud mayor que la de la molécula que dará lugar al sitio de ácido acético del PBG.

En la Figura III.3. vemos que la molécula de ALA forma una base de Schiff con la enzima (etapa 2), y seguidamente la segunda molécula de sustrato da lugar a otra base de Schiff intermedia (etapa 3). El PBG se formaría siguiendo la secuencia indicada.

III.5. Activación e inhibición del ALA-D

III.5.1. Activación

El ALA-D puede modificar su actividad por cambios de pH, temperatura, presencia de ciertos metales o sustancias orgánicas, concentración del sustrato y producto de la reacción. Se analiza-

rán entonces aquellos factores que poseen una acción activadora del ALA-D.

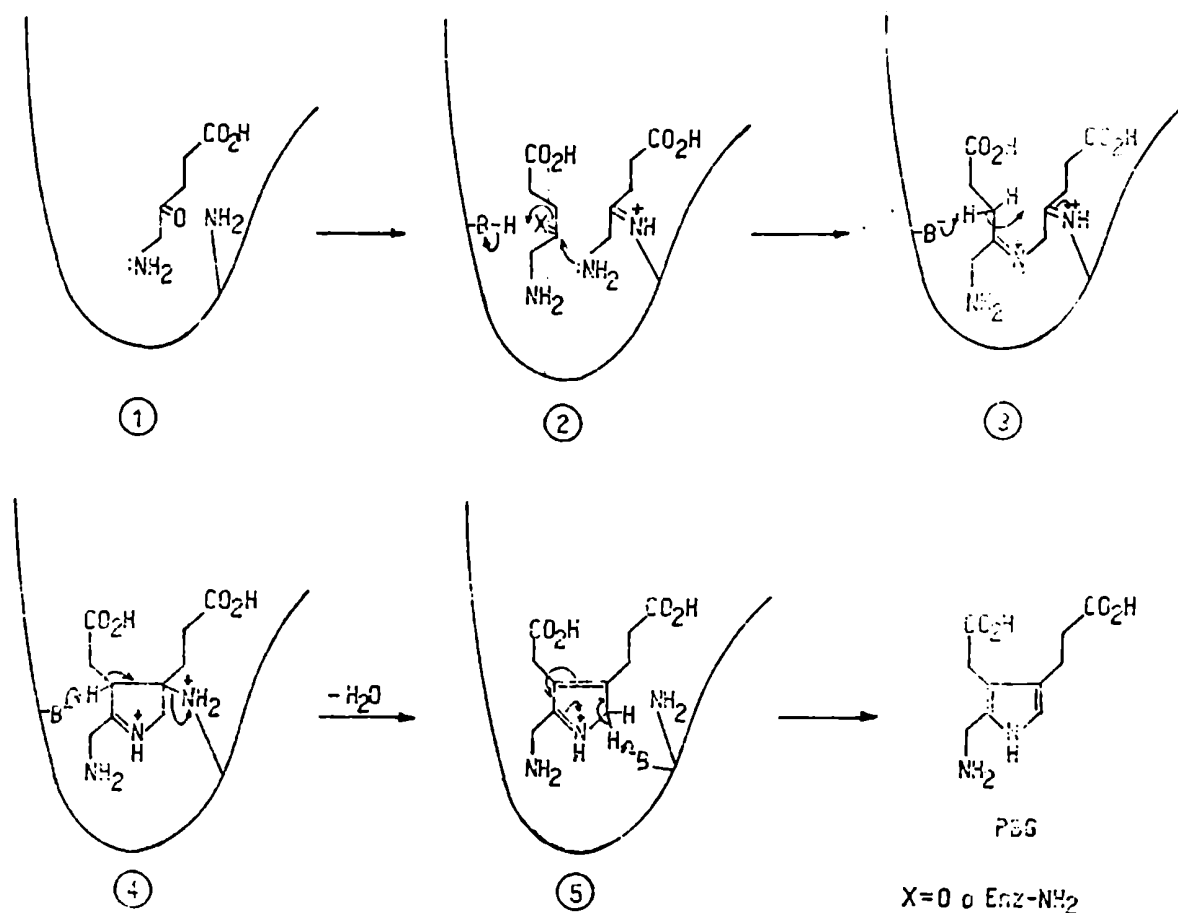


FIGURA III.3.: Mecanismo de acción del ALA-Dehidrasa propuesto por Jordan y Seehra (1980)

III.5.2. Coenzimas

No está definitivamente probado que existan cofactores, es decir grupos prostéticos de una coenzima en el sentido convencional, para el ALA-D (Gibson y col, 1955), aunque, por ejemplo, el fosfato de piridoxal (vit. B_6) *in vitro* activa la formación de PBG a partir de ALA (Heilmeyer, 1967). Inicialmente se había atribuido un rol similar a los iones cobre, que se encontraban en una relación de 0,1% en una preparación purificada de la enzima (Iodice y col, 1958); sin embargo, luego se pudo aislar la enzima activa totalmente libre de cobre (Wilson y col, 1959). Recientemente, se ha demostrado que el ALA-D es en realidad una

Zn-enzima conteniendo un átomo de Zn por subunidad. La apoenzima libre de Zn es inactiva y sólo recupera su actividad cuando se reconstituye la holoenzima nativa mediante el agregado de Zn (Tsukamoto y col, 1980). En este sentido podríamos afirmar que el Zn se comporta como un grupo prostético del ALA-D.

III.5.3. Metales alcalinos

Se conocen como activadores aquellas sustancias cuya presencia es importante para la acción de la enzima y que probablemente sólo están unidos débilmente a la proteína.

El ALA-D modifica su actividad por efecto de distintos activadores. Burnham y Lascelles (1963), y después Nandi y Shemin (1968) observaron que el ALA-D parcialmente purificada de *Rp. spheroides*, requiere K^+ para un máximo de actividad, independientemente del anión que lo acompañara, fosfato o cloruro. Se determinó que la concentración óptima de K^+ estaba entre 1 y 3×10^{-2} M. Heyningen y Shemin (1970) confirmaron la activación alostérica del ALA-D de *Rp. spheroides* por iones K^+ . Este efecto se expresa en una disminución de la constante de Michaelis-Menten (K_m) en presencia de estos iones.

Sin embargo, la enzima aislada de trigo no requiere K^+ para su actividad (Nandi y Waygood, 1967). Tampoco el ALA-D de hojas de espinaca y tabaco (Shetty y Miller, 1969), en tanto que concentraciones de K^+ aproximadamente 0,1 M inhiben la enzima de soya (Tigier y col, 1970). Además de los iones Zn^{2+} , Ca^{2+} y Fe^{2+} , los iones K^+ no tenían ningún efecto sobre la enzima aislada de *Spirillum (S) itersonii* (Ho y Lascelles, 1971). Otros metales alcalinos, como los iones Li y Rb, así como los iones NH_4 , ejercen un potente efecto activador sobre el ALA-D de origen bacteriano (Nandi y col, 1968). La influencia del Na^+ y NH_4^+ es leve sobre la enzima de origen vegetal (Schneider, 1970).

III.5.4. Metales alcalino térreos

Los cationes divalentes tales como Mg^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} activan el ALA-D de hojas de trigo (Nandi y Waygood, 1967). Mientras que los iones Mg^{2+} disminuyen el K_m de 1×10^{-3} a $3,1 \times 10^{-4}$ moles/litro, los iones Mn^{2+} provocan una disminución mayor del K_m hasta $3,7 \times 10^{-5}$ moles/litro (Nandi y Waygood, 1967).

A pesar de provenir de fuentes diferentes, las enzimas de *Rp. spheroides* y tabaco (Nandi y col, 1968; Shetty y Miller, 1969) se activan por bajas concentraciones de iones Mn^{2+} , mientras que concentraciones mayores de Mn^{2+} ($2,5 \times 10^{-3}$ M) son inhibitorias (Shetty y Miller, 1969). Los iones Mn^{+} también activan la Dehidrasa aislada de *S. itersonii* por Ho y Lascelles (1971). Estos autores propusieron que los iones magnesio son absolutamente necesarios para la máxima actividad enzimática. Estos mismos iones son asimismo activadores relativamente potentes de la enzima de *Rp. spheroides* (Nandi y col, 1968). Aparentemente, modifican la estructura molecular de la enzima, produciendo una forma más activa, efecto que se traduce en una disminución del Km. El mecanismo es probablemente diferente del ejercido por el K^{+} (Nandi y Shemin, 1968 a). Por el contrario, dependiendo de la concentración y el anión empleado, el Mg puede inhibir el ALA-D de glándula de Harder de rata (Tomio y col, 1968). Los iones Mg^{2+} , Mn^{2+} y Ba^{2+} en concentraciones de 10^{-2} M no tienen influencia sobre la enzima de hígado de ratón y buey (Coleman, 1966; Gibson y col, 1955).

Cuando se purifica el ALA-D por métodos tradicionales suele presentar y conservar una baja actividad enzimática, excepto que se la suplemente con reactivos tiólicos. Se sabe que el ALA-D de mamíferos es una enzima que contiene Zn (Gurba y col, 1972; Cheh y Neilands, 1973), aunque es una metaloenzima atípica ya que a menudo lo pierde en el curso de su purificación. Aún no está dilucidado el rol del Zn en la relación estructura-función de la enzima.

Si se agregaba Zn y mercaptoetanol en el curso de la purificación del ALA-D de hígado bovino, la enzima conservaba su máxima actividad aún en ausencia de activadores tiólicos (Tsukamoto y col, 1979), y contenía un átomo de Zn por subunidad, y ocho grupos SH por subunidad.

La titulación de la apoenzima con Zn reveló un sitio de alta afinidad por el Zn en cada subunidad.

La modificación de los grupos SH del ALA-D por oxidación con aire, reacción con DTNB o 1,3-dibromoacetona o formación de mercapturos con metales, producía una disminución de la actividad enzimática con liberación simultánea de Zn. La apoenzima oxidada necesitaba de un activador tiólico para incorporar Zn. Estos resultados sugieren que en el sitio activo de la enzima se

encuentran involucrados un átomo de Zn y por lo menos dos residuos cisteína. El rol del Zn podría ser el de proteger a los grupos SH de la autooxidación probablemente coordinándose con ellos. Esta hipótesis, está apoyada por la observación de que cuando se elimina el Zn, tiene lugar una rápida formación de una unión disulfuro.

Los estudios de fotooxidación indican que existen por lo menos dos residuos histidina en el sitio activo, y posiblemente uno de ellos también participe de la unión con el Zn (Tsukamoto y col, 1980).

Según estos autores, el Zn no es absolutamente esencial para la función catalítica de la enzima, ya que la enzima totalmente libre de Zn conserva casi su máxima actividad si se la mantiene en condiciones estrictamente anaeróbicas. Esto sugiere que en ausencia de Zn, puede ocurrir un leve cambio conformacional que facilitaría la formación de puentes disulfuro (Tsukamoto y col, 1979).

III.5.5. Buffers

Muchos autores observaron que el ÁLA-D se comporta de manera diferente cuando se usan diferentes buffers. La Dehidrasa de hígado de buey, por ejemplo, era totalmente inactiva en buffer Tris hasta pH 7,6, mientras que mostraba un aumento de actividad entre pH 7,6 y 8,2 (Shetty y Miller, 1969). El ALA-D de hígado de ratón era tan activa en buffer Tris como en fosfato (Coleman, 1966); mientras que el Tris también aumentaba la actividad de la enzima de soya (Tiqier y col, 1968; 1970). La enzima aislada de glándula de Harder se inactivaba totalmente en buffer Tris $5 \times 10^{-2} M$ (Tomio y col, 1968). Gibson y col (1955) encontraron que la enzima aislada era completamente inactiva en buffer Tris pero activa en mezclas de buffer que contenía fosfato, arseniato y bicarbonato mientras que en ensayos preliminares, ninguno de estos aniones había sido necesario. Esto fue confirmado para la enzima de tabaco y se observó un leve aumento de actividad en Tris-HCl hasta pH 9.0 (Shetty y Miller, 1969); además, los iones fosfato, arseniato y bicarbonato, parecen activar la dehidrasa de hígado de buey y de tabaco en presencia de Tris-HCl (Shetty y Miller, 1969).

Estudios con eritrocitos humanos demostraron que los fosfatos en una concentración de 6×10^{-2} M inhiben casi completamente la formación de PBG *in vitro*, mientras que una concentración de $3,3 \times 10^{-2}$ M, la reducen a la mitad (Rubino y col, 1960).

III.5.6. Acido δ -Aminolevúlico

Con el objeto de determinar la influencia del mismo sustrato sobre la actividad del ALA-D, se inyectó δ -ALA en ratones, observándose un aumento de actividad de 2 a 3 veces de la enzima hepática (Russell y Coleman, 1963), comparada con los controles, probablemente como resultado de la activación directa de la enzima por el sustrato, más que de la síntesis de novo de la proteína enzimática (Onisawa y Labbe, 1962).

III.5.7. Sustancias inductoras de porfiria y anemia

Las sustancias porfirinogénicas como el Sedormid (β -alil-isopropil-urea), AIA (β -alil-isopropil-acetamida) y DDC (3,5-dicarbetoxi-dihidro-colidina) poseen grupos ceto que, al menos el Sedormid, pueden formar enolatos y hemiacetales con los grupos SH libres (Barreiro, 1969). Sin embargo, no tienen influencia sobre la actividad del ALA-D de hígado y bazo de ratón (Coleman, 1966), lo cual está en contradicción con el marcado aumento de actividad de esta enzima en el hígado y riñones de conejos y ratas tratadas con AIA y Sedormid (Marver y col, 1966; Narisawa y Kikuchi, 1966; Tancioni y col, 1964); de todas maneras, la actividad en sangre y bazo en estos casos fue normal (Gibson y col, 1955).

Las respuestas a los compuestos porfirinogénicos son probablemente específicos de cada especie, ya que también fueron observados en conejillos de indias tratados con DDC (Granick y Urata, 1963).

Los estudios de De Matteis y Gibbs (1972) revelaron que el DDC, dentro de la hora siguiente a la administración inhibe la ferroquelatasa mitocondrial y que ésta sería la causa primera de esta porfiria experimental. Marver y col (1966) también encontraron que el incremento de actividad inducido por AIA puede

prevenirse por adición de glucosa. Por otro lado, si se agrega 0,2-2% en el medio de cultivo de tejido de soya, la actividad del ALA-D aumenta luego de un prolongado período de crecimiento, mientras que tal aumento no ocurre si el extracto enzimático se incubaba con AIA *in vitro* (Tigier y col, 1970).

Repetidas inyecciones de fenilhidrazina, que producen anemia en conejos y ratones, daban lugar a un aumento sustancial de la actividad del ALA-D de bazo (Coleman, 1966; Gibson y col, 1955; Margolis y Russell, 1965), probablemente como resultado de un incremento en la hematopoesis extramedular (Gibson y col, 1955). No se obtuvieron resultados similares en el hígado (Gibson y col, 1955).

III.5.8. Activadores tiólicos

Una demostrada característica del ALA-D es su naturaleza sulfhidrónica. Las enzimas de hígado de ratón (Coleman, 1966), *Neurospora crassa* (Mutukrishnan y col, 1972), *Rp. spheroides* (Nandi y col, 1968) e hígado de buey (Gibson y col, 1955), requieren activadores de grupos tioles y ligandos de sulfhidrilos para su máxima actividad *in vitro*.

Estos son principalmente glutatión (GSH) y cisteína (CiSH) que también ejercen acción activante sobre el ALA-D de trigo (Nandi y Waygood, 1967), o bien sustancias como el β -mercaptoetanol y ditiotreitól, que son activadores de las enzimas de *S. itersonii* (Ho y Lascelles, 1971), *Rp. spheroides* (Nandi y col, 1968) e hígado de mamíferos (Coleman, 1966). Es notable que la enzima pura y la parcialmente purificada de tejido de soya no dependen de la presencia de GSH o CiSH para su máxima actividad (Tigier y col, 1968; 1970), y los activadores tiólicos ditiotreitól y tioglicolato de Na la inhiben parcialmente (Tigier y col, 1968). Si en la mezcla de reacción la concentración de GSH excede la concentración óptima de $3,3 \times 10^{-3}$ M, el ALA-D de hígado de rata y de sangre humana pierde rápidamente su actividad (Moore y col, 1971). La observación de Barreiro (1967; 1969), que concentraciones crecientes de CiSH causan una disminución de la actividad enzimática de levaduras e hígado de conejo y así una disminución en la formación de PBG, también fue demostrada por Batlle y col (1967), quienes encontraron completa inactivación del

ALA-D de hígado bovino por concentraciones relativamente altas de CiSH (0,1 molar).

Como los grupos sulfhidrilos se combinan con los grupos carbonilo para dar tiohemiacetales, se supone que la inhibición se produce por una reacción de los grupos -SH con los grupos ceto del δ -ALA (Barreiro, 1967; 1969), y, de hecho, la unión del δ -ALA y la cisteína puede demostrarse espectrofotométricamente.

La disminución en la concentración disponible de sustrato por su reacción con el tiol explicaría la menor actividad de la enzima en estas condiciones (Barreiro, 1967). Así, mientras que la concentración de CiSH permanece constante, la velocidad de turnover del ALA aumenta si la concentración de ALA aumenta en el sistema (Barreiro, 1969). De esto se concluye que la relación ALA/CiSH es, probablemente, de particular importancia tanto *in vitro* como *in vivo*.

Los metabolitos simples como CiSH, GSH y otros grupos SH libres pueden, de esta manera, por un lado mantener la actividad de la enzima, y por otro, disminuir la velocidad de la reacción catalizada por el ALA-D, reaccionando químicamente con el sustrato (Barreiro, 1969).

III.6. Inhibición

Los inactivadores pueden actuar por diferentes mecanismos: por cambios químicos de un grupo esencial de la proteína enzimática o por cambios menos específicos de la molécula proteica. Como ya se mencionó, el ALA-D posee grupos SH que son indispensables para su actividad y su bloqueo lleva a la pérdida de la actividad enzimática.

III.6.1. Reactivos sulfhidrúlicos específicos

Los grupos sulfhidrilo pueden bloquearse por reactivos específicos que actúan por alquilación irreversible (iodo acetato, iodo acetamida), unión con un compuesto órgano-metálico de mercurio (p-cloromercuribenzoato, PCMB) o por oxidación a disulfuros (R-S-S-R'). La dehidrasa de origen bacteriano se inhibe completamente por PCMB $3,3 \times 10^{-4}$ M, mientras que la iodoacetamida es

menos efectiva (Nandi y col, 1968). En estudios anteriores con la enzima de hígado de buey, se encontró completa inhibición, revertida parcialmente por adición de una cantidad equimolar de GSH (Gibson y col, 1955). Puede obtenerse una marcada inhibición con estos tioles sobre la enzima de vegetales y levaduras (Nandi y Waygood, 1967; Tigier y col, 1968, 1970; Barreiro, 1969). El PCMB, iodoacetamida y otros inhibidores como la N-etil-maleimida, iodobenzoato y 5-5'-ditio-bis-(2-nitro-benzoico) son potentes inhibidores del ALA-D de hígado de buey (Batlle y col, 1967). Además de los reactivos ya mencionados, el ditionitrobenzoato inactivaba el ALA-D de glándula de Harder de rata (Tomio y col, 1968). La enzima de *N. crassa* (Muthukrishnan y col, 1972) se inhibía completamente con p-hidroximercuribenzoato. El iodoacetato también actuaba sobre los grupos -SH de la enzima de *Ustilago spherogena* (Komai y Neilands, 1968). Estos hallazgos señalan la importancia de los grupos -SH para la actividad del ALA-D, acerca de los cuales hay trabajos recientes que han investigado su número y función.

La reacción del ALA-D nativa reducida, con DTNB reveló la presencia de dos grupos tioles altamente reactivos (grupos I y II), un grupo de mediana reactividad (grupo III) y un grupo de muy baja reactividad (grupo IV) (Figura III.4.) (Seehra y col, 1981).

Los grupos I y II parecen ser muy importantes en su papel de unión con el Zn, y estarían en el sitio activo. La reacción de estos grupos con el DTNB da como resultado un disulfuro intramolecular que puede ser reducido con ditionitrobenzoato para regenerar los grupos sulfhidrilos libres.

El grupo III parece estar involucrado en el mantenimiento de la conformación de la enzima nativa, ya que la modificación de este grupo resulta en una pérdida irreversible de la actividad.

Tsukamoto y col (1979) encontraron que la enzima conserva su actividad mientras los dos grupos -SH del sitio activo permanezcan reducidos, aún en ausencia de Zn. La actividad enzimática se pierde completamente, así como el Zn unido, luego de la oxidación de los grupos -SH a disulfuro, de la modificación de los grupos -SH por agentes químicos o por formación de mercapturos con metales pesados. Según estos autores, el Zn no sería absoluta

mente esencial para la actividad, pero se requeriría para prevenir la autooxidación de los grupos SH esenciales; sin embargo, estudios muy recientes no estarían totalmente de acuerdo con esta hipótesis, por cuanto la apoenzima libre de Zn, aún con los restos SH reducidos, es inactiva y necesitaría de los iones metálicos para su reactivación.

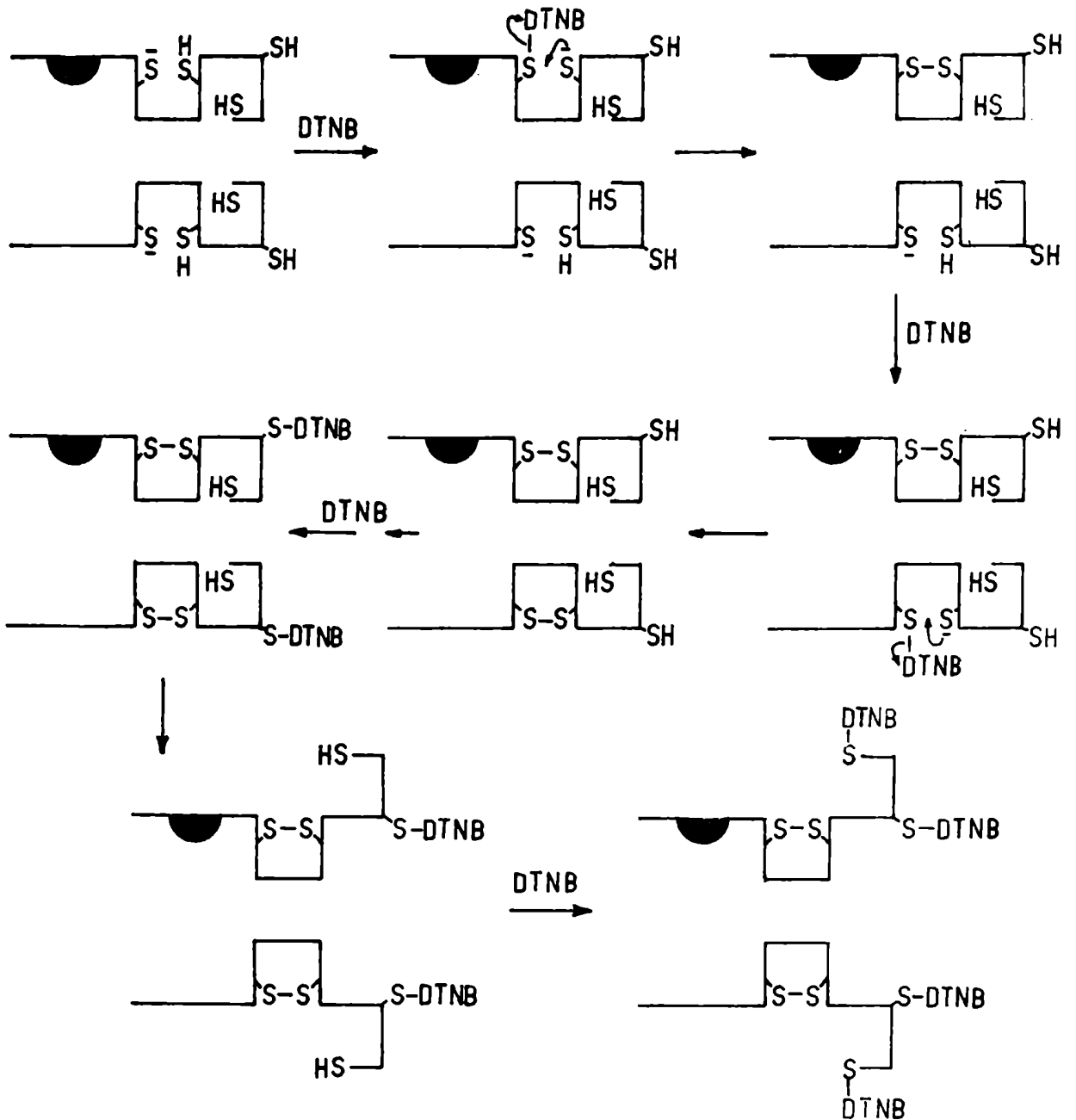


FIGURA III.4.: Mecanismo de acción del ALA-D con DTNB

III.6.2. Reactivos quelantes de metales

Con el objeto de investigar la posible necesidad de iones metálicos para la actividad enzimática, se estudió la influencia de quelantes de metales. Se obtuvieron resultados muy variados:

El EDTA, un quelante inespecífico de metales, es un potente inhibidor de la enzima de fuentes animales. Concentraciones del orden de 10^{-4} M inhibían completamente el ALA-D de hígado de buey (Gibson y col, 1955) y aproximadamente 70% la de reticulocitos de conejo (Granick y Mauzerall, 1958), y a 10^{-3} M, se inhibía más del 90% la enzima de hígado bovino y de rata (Gurba y col, 1972).

El ALA-D de eritrocitos de ave sólo se inhibe parcialmente por EDTA 10^{-5} M y este efecto no aumenta con concentraciones tan altas como 10^{-2} M (Granick y Mauzerall, 1958). La acción del EDTA puede deberse a un cambio en la configuración de la enzima o a la captura de un metal esencial para su actividad. Usando concentraciones crecientes de sustrato se encontró que el mecanismo de inhibición es no-competitivo (Granick y Mauzerall, 1958).

Aunque el ALA-D purificada de glándula de Harder de rata aparentemente no requiere iones metálicos para su actividad, la formación de PBG se inhibe completamente por adición de EDTA 10^{-3} M (Tomio y col, 1968).

El ALA-D de origen animal no se inhibe con Ca-EDTA, sino que presenta un efecto estimulante sobre la actividad de la enzima de hígado de ratón (Coleman, 1966). El EDTA 10^{-2} M, así como los iones Mg^{2+} , revierten la acción inhibitoria de los iones Cu^{2+} (Coleman, 1966). El ALA-D de *Rp. spheroides* no se inhibía por EDTA (4×10^{-3} M) (Shemin, 1962; Burnham y Lascelles, 1963). La enzima de *Mycobacterium phlei* perdía su actividad casi completamente *in vitro* luego de la adición de EDTA ($6,7 \times 10^{-6}$ moles/muestra) (Yamasaki y Moriyama, 1971), pero se reactivaba por adición de iones Mg^{2+} . Observaciones similares se hicieron con *N. crassa* (Muthukrishnan y col, 1969); en este caso los iones Zn^{2+} neutralizaban la pérdida de actividad. Las dehidrasas de origen vegetal se inhiben fuertemente por EDTA (Shetty y Miller, 1969; Tigier y col, 1970); los iones Mn^{2+} (Nandi y Waygood, 1967) y Mg^{2+} (Schneider, 1970) reactivan la enzima.

El ALA-D aislada de hígado bovino y de rata es fuertemen

te inhibida por otros agentes quelantes, como por ejemplo, la 8-hidroxiquinolina, 2,2'-bipiridina y o-fenantrolina, lo cual ha sugerido que iones metálicos bivalentes están involucrados en el sitio activo de la enzima (Gurba y col, 1972). Como se sabe, el ALA-D purificada de hígado de buey es una Zn-enzima.

Además del EDTA, la 1,10-fenantrolina, 2,2'-bipiridina y 8-hidroxiquinolina inhibían el ALA-D de *Ustilago spherogena* (Komai y Neilands, 1969); la velocidad de inhibición aumentaba con la concentración de estas sustancias. El hallazgo de agentes como la 8-hidroxiquinolina-5-ácido sulfónico y 8-hidroxi-7-iodoquinolina-5-ácido sulfónico que, en concentración 10^{-5} M causaban 80% de inhibición, sugería que la inhibición se debía a un grupo ácido sulfónico más que a propiedades quelantes de estos compuestos (Gibson y col, 1955). Esto estaba apoyado por el hecho de que la 8-hidroxiquinolina, 8-hidroxiquinaldina, ácido quinaldínico y ácido picrolónico, no eran inhibitorios (Gibson y col, 1955).

Komai y Neilands (1969), investigando la acción de los agentes quelantes de Cu sobre la enzima de *Ustilago*, confirmaron la potente acción inhibitoria del BCS (disulfonato sódico de la batocuprofina) y Neocuprofina (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina); pero el Cuprizone (bis-ciclohexanona oxaldihidrazona), que es específico para iones Cu^{2+} , y el dietilditiocarbamato no tenían efecto. El acetonitrilperclorato de Cu, una sustancia utilizada para la regeneración de proteínas cúpricas, mostraban acción inhibitoria sobre la dehidrasa de *Ustilago spherogena*.

III.6.3. Sulfitos

La leve inhibición del ALA-D de hígado de buey por sulfitos en concentración 10^{-2} M descrita por Battle y col (1967), despertó la sospecha de la posible presencia de grupos disulfuro en la proteína enzimática. Así, los autores sugirieron que la enzima podría requerir de grupos disulfuro para su actividad, manteniendo estos grupos una estructura proteica específica, o que se necesitaría cierto equilibrio entre los grupos tioles y los grupos disulfuro.

III.6.4. Inhibidores específicos

III.6.4.1. Aminocetoácidos

Los inhibidores específicos presentan particular interés ya que con frecuencia permiten obtener información útil con respecto a la especificidad de la enzima y su mecanismo de acción.

Los aminocetoácidos relacionados con el δ -ALA, tales como el ácido 6-amino-6-ceto-hexanoico, ácido δ -amino- β -metillevulínico, ácido δ -amino- α -metillevulínico y ácido δ -amino- δ -metillevulínico, inhibían la dehidrasa de *Rp. spheroides* en forma competitiva y no actuaban como sustrato de la enzima (Lartillot y Baron, 1967). Aunque el ácido levulínico y su etil éster forman una base de Schiff con la enzima (sólo los γ -cetoácidos, y no los α -cetoácidos, reaccionan formando una base de Schiff con la enzima) únicamente el ácido libre actúa como inhibidor competitivo de la enzima bacteriana (Nandi y Shemin, 1968 b; Yamasaki y Moriyama, 1971; Ho y Lascelles, 1971). La afinidad del etil éster del ácido levulínico aparentemente no es suficiente como para inhibir a la enzima (Nandi y Shemin, 1968 b). El ácido levulínico y el succinato semialdehído se comportan también como inhibidores competitivos del ALA-D de mamíferos (Granick y Mauzerall, 1958).

La dehidrasa de *Mycobacterium phlei* es inhibida de manera competitiva pura por el ácido δ -hidroxilevulínico y δ -hidroxi- γ -oxo-L-norvalina, un aminoácido antituberculosis (Yamasaki y Moriyama, 1971). Mientras que el ácido δ -oximilevulínico en bajas concentraciones causaba una inhibición competitiva significativa del ALA-D de hígado de ratón, para lograr una inactivación de orden similar, se requerían concentraciones relativamente altas de ácido δ -clorilevulínico, ácido δ -acetamido levulínico, ácido β -cetoadípico y ácido 4-amino-tiazole-4-propiónico. Resultados análogos se encontraron en preparaciones de hojas de trigo (Tschudy y col, 1966).

Estos datos estaban sugiriendo que para la unión enzima: sustrato eran esenciales un grupo carboxilo libre del sustrato y la formación de una base de Schiff.

Recientemente se ha demostrado que la succinilacetona (y su pirrol) es un inhibidor muy potente y relativamente, muy

específico del ALA-D. De acuerdo a su estructura y a una serie de propiedades, se ha sugerido que reacciona con el sitio catalítico de la enzima inhibiéndola en forma competitiva, y se ha desarrollado un elegante procedimiento que permite titular el número de sitios activos del ALA-D por unidad de enzima, aún en preparaciones crudas.

Su acción inhibitoria sobre el ALA-D también se ha demostrado *in vivo*. Inyectando succinilacetona a ratones se observa una rápida caída del ALA-D hepática.

La acumulación de succinilacetona en tirosinemia explica el aumento de excreción urinaria de ALA y la actividad reducida del ALA-D que caracteriza a esta enfermedad (Tschudy y col, 1981; Brumm y Friedmann, 1981; Strife y col, 1977; Ebert y col, 1979).

III.6.4.2. Hemo y compuestos hémicos

La observación de Burnham y Lascelles (1963) que el ALA-D de *Rp. spheroides* se inhibía levemente por bajas concentraciones de hemina (FeIII protoporfirina) fue confirmada en ALA-D de hígado de ratón (Coleman, 1966), *Mycobacterium phlei* (Yamasaki y Moriyama, 1971) y *S. itersonii* (Ho y Lascelles, 1971), aunque en este último, el hemo ejerce una acción inhibitoria todavía menor.

La hematina también es capaz de inhibir competitivamente la enzima de hígado de ratón, con una constante de inhibición K_i de $7,1 \times 10^{-6}$ M (Doyle y Schimke, 1969).

Para determinar la influencia de la FeII-protoporfirina y sus derivados, se ensayó el efecto del hemo y hemoproteínas tales como hemoglobina, citocromo c y catalasa sobre el ALA-D de eritrocitos humanos (Calissano y col, 1966). Se encontró que sólo el hemo libre y el hemo unido a la globina, pero no el hemo unido a otras proteínas, en concentraciones entre 0,01 y 0,1 μ M hemo/ml provocan una inhibición casi total de la enzima, aumentando el K_m de $8,3 \times 10^{-5}$ M a $3,2 \times 10^{-4}$ M. La inhibición por hemo, que es mucho más marcada con enzima purificada que con extractos crudos, es competitiva y tiene un K_i de $3,5 \times 10^{-4}$ M.

III.6.4.3. Protoporfirina y Coproporfirina

La protoporfirina IX es un inhibidor del ALA-D de GR humanos y *Rp. spheroides* (Steiner y col., 1964; Nandi y col., 1968) pero mucho más débil para la enzima de *S. itersonii* (Ho y Lascelles, 1971). Está en estudio el mecanismo exacto de esta inhibición. La hematina, protoporfirina IX, hemoglobina y citocromo c en concentraciones hasta 10^{-4} M no tienen efecto sobre la enzima de origen vegetal (Shetty y Miller, 1969).

Mientras que la inhibición por hemina, protoporfirina y protoporfirinógeno era baja o insignificante, la coproporfirina III y el coproporfirinógeno III resultan inhibidores más efectivos del ALA-D de *Neurospora crassa* (Muthukrishnan y col., 1972).

Cuando la *Neurospora crassa* se hace crecer en condiciones de deficiencia de hierro, la actividad de ALA-D es casi indetectable, pero aumenta significativamente cuando se agrega hierro; sin embargo, este aumento puede bloquearse por adición de protoporfirina. Se estudió entonces si el hierro actuaba directamente a nivel genético o simplemente eliminando la protoporfirina del medio mediante su conversión en hemo (Chandrika y col., 1980). Se encontró que inhibiendo la síntesis de hemo con ácido levulínico o cianuro, se inducía la síntesis de ALA-D, mientras que si se inhibía un paso posterior a la formación de protoporfirina (por deficiencia de hierro o tratamiento con cobalto), se reprimía la enzima. Cuando los niveles de protoporfirina disminuían por debajo de su valor óptimo, se inducía el ALA-D y cuando aumentaban, se reprimía esta enzima. El ácido levulínico y el cianuro pueden inducir a la enzima aún en ausencia de hierro, indicando que este metal sólo actúa convirtiendo la protoporfirina en hemo.

En base a estos datos, se ha sugerido que la protoporfirina es el regulador fisiológico del ALA-D en *N. crassa*.

También se determinó el efecto de copro, proto y hemina sobre la actividad del ALA-D de *Euglena gracilis* *in vivo* e *in vitro*. Estos metabolitos casi no tienen acción *in vivo* aunque *in vitro* el efecto es mucho mayor, produciendo copro y proto una inhibición del 50%. Los porfirinógenos correspondientes se comportan en forma análoga, respondiendo su efecto a un tipo de inhibición por feed-back, como se encontró en otras fuentes (Stella, 1977).

III.6.4.4. Urea y Derivados

Mientras que urea y guanidina en altas concentraciones desnaturalizan proteínas, bajas concentraciones de urea, guanidina y metil derivados de la urea inhibían competitivamente una preparación purificada de ALA-D de *Rp. spheroides* (Nandi, 1971). Estos compuestos podrían interferir con la formación del complejo enzima-sustrato, actuando sobre puentes hidrógeno del sitio activo. Sin embargo, la inhibición del ALA-D es reversible, lo cual estaría indicando entonces que la inactivación resulta de la disociación de la enzima en subunidades, aunque puede prevenirse por el sustrato, probablemente por competición con la urea por el sitio activo de la enzima. Como una explicación del tipo de inhibición competitiva de la urea o la guanidina, los autores sugieren la existencia de una acción combinada del sustrato por un lado y del agente desnaturalizante por el otro, que de todas maneras influye sobre la conformación de la proteína enzimática y en consecuencia, sobre su actividad.

Cuando la enzima soluble se trató con concentraciones crecientes de urea (Batlle y col, 1978), la inhibición aumentaba rápidamente con la concentración de urea, alcanzando el 100% de inhibición a 2 M, siendo esta inhibición reversible en un 70%.

Cuando la enzima proveniente de hígado bovino se inmovilizó sobre Sepharosa 4B, y se trató a ésta con urea 3 y 6 M, se detectó actividad en los eluidos. Si se eliminaba la urea del gel, éste volvía a presentar actividad en todos los casos, aunque el porcentaje dependía de la concentración de urea utilizada (Batlle y col, 1978).

Como la inactivación por urea se produce por la disociación de la enzima en subunidades (Nandi, 1971), es lógico suponer que luego de la eliminación del agente disociante, la enzima, presente en polipéptidos individuales, puede volver a asociarse en la forma octamérica original.

III.6.4.5. Fosfato de piridoxal, Fosfatos de alta energía e Inhibidores endógenos

El fosfato de piridoxal, un cofactor del ALA-Sintetasa, inhibe alrededor del 30% del ALA-D de *Rp. spheroides* a una con-

concentración de 10^{-3} M, respondiendo a un tipo de inhibición no competitivo. El tiempo de incubación no influye sobre el grado de inhibición (Heyningen y Shemin, 1971b). Los fosfatos de piridoxal y piridoxamina tienen el mismo efecto, pero la piridina, el benzaldehído y la piridina-4-carboxaldehído no modifican la actividad del ALA-D. De manera que la acción inhibitoria parece que es propia de la molécula de piridoxal.

Además, es notable que compuestos de alta energía de origen celular tales como pirofosfatos, ATP, UTP, GTP o ITP a ciertas concentraciones inhiben casi completamente el ALA-D de fuentes vegetales (Nandi y Waygood, 1967; Tigier y col, 1970), excepto la enzima de tabaco que sólo se afecta levemente aún a concentraciones relativamente altas (Shetty y Miller, 1969).

Durante el proceso de purificación del ALA-D a partir de extractos de trigo, resultó aparente la existencia de un inhibidor endógeno en este tejido (Nandi y Waygood, 1967). Un inhibidor de bajo PM podría estar presente también en tejidos de soya (Tigier y col, 1970). En extractos de *M. crassa* se ha descrito asimismo la presencia de un inhibidor termolábil de naturaleza proteica (Muthukrishnan y col, 1969). Sin embargo, en ninguno de estos tres casos se ha logrado separar claramente e identificar ese probable regulador de la actividad del ALA-D.

III.7. Significado Biológico y Bioquímico

III.7.1. Ontogénesis y actividad enzimática

La actividad del ALA-D está estrechamente relacionada con la madurez general de un organismo, así como de la maduración de sus células. Su actividad es máxima en eritroblastos, que presentan máxima síntesis de hemo (Battistini y col, 1971). El eritrocito humano maduro no contiene las enzimas de la síntesis de hemo que están unidas a mitocondrias (Schmid y Shemin, 1955; Rimington y Booi; 1957; Granick y Levere, 1964), ya que no posee mitocondrias, pero contiene ALA-D y las demás enzimas citoplasmáticas de la síntesis de porfirinas. Aunque sólo un remanente del contenido de enzimas celulares permanece, los eritrocitos anucleados poseen la misma concentración de ALA-D que los eritroblastos nucleados y con mitocondrias. Sin embargo, es

probable que la enzima ya no tenga importancia funcional en el eritroblasto maduro, dado que en esta célula no hay síntesis de hemo.

Para ser precisos, la actividad debería medirse en las células de la médula ósea, pero, obviamente, esto presenta muchas dificultades (Iwanow, 1968).

La actividad del ALA-D hepático parece ser mucho mayor durante el desarrollo embrionario que en el hígado de un ratón adulto; el nivel normal se alcanza en el momento del nacimiento (Freshney y Paul, 1971). El aumento de actividad en el estado embrionario está probablemente relacionado con la gran proporción de células eritroides en el hígado fetal (Freshney y Paul, 1971). Inmediatamente después del nacimiento la actividad decrece, posiblemente porque la hematopoesis ocurre ahora en la médula ósea, y luego aumenta lentamente (Russell y Coleman, 1963). A partir de análisis inmunológicos se concluyó que el ALA-D fetal con respecto a su efectividad como antígeno, es catalíticamente dos veces más activa que la enzima adulta (Doyle y Schimke, 1969); el aumento de actividad específica de la enzima fetal comparada con la enzima adulta puede deberse a la presencia de un activador en el tejido, a una estructura terciaria más efectiva o a una estructura primaria modificada que afecte el aspecto catalítico pero no el antigénico (Doyle y Schimke, 1969). Sin embargo, este aspecto no ha sido aún dilucidado. Se encontró también que el ALA-D fetal es menos lábil al calor y más estable a la tripsina; esto podría indicar una estructura primaria diferente (Doyle y Schimke, 1969). No se registraron diferencias importantes para otros criterios fisicoquímicos.

III.7.2. Aspectos genéticos

En varios tejidos de ratón, el ALA-D está controlada por un gen simple que ha sido llamado "locus levulinato" (Lv) (Coleman, 1966; Russell y Coleman, 1963). Este gen parece ser no sólo un regulador específico para la síntesis de hemoglobina, ya que actúa también sobre los niveles de ALA-D en hígado, riñón y bazo, y la actividad de la enzima en los órganos individuales puede ser diferente (Fowler y col, 1967). Aunque los ratones adultos normales examinados pertenecieran a la misma cepa, sus actividades enzimáticas eran diferentes. Se dividieron así, en dos gru

pos con dos factores genéticos; el factor Lv^a parece tener 2 a 3 veces más actividad que el factor Lv^b (Coleman, 1966; Russell y Coleman, 1963). Para explicar la observación de que la actividad del ALA-D hepática en ratones de cepas relacionadas estaba entre los de Lv^a y Lv^b , se sugirió la existencia de un tercer gen Lv^c , como causa de este nivel medio de actividad (Hutton y Coleman, 1969). El ALA-D de bazo e hígado de cada genotipo (Lv^a/Lv^a y Lv^b/Lv^b) tienen idénticas características físicas, químicas y enzimáticas. Esto llevó a la conclusión de que la estructura primaria de los dos genotipos es idéntica y que el gen Lv gobierna la cantidad de enzima más que su estructura (Coleman, 1966).

Por métodos inmunoquímicos e isotópicos se demostró que las diferentes actividades enzimáticas se deben a diferentes cantidades de proteína enzimática y que el gen Lv regula la concentración del ALA-D hepática actuando a nivel de la síntesis de la enzima. Según esta hipótesis debería haber una menor síntesis enzimática en los ratones Lv^b (Doyle y Schimke, 1969). A pesar de esto, no mostraban anomalías en la sangre y la hematopoyesis, y la síntesis de hemo se mantenían en un nivel satisfactorio.

Las dehidrasas de tejidos hematopoiéticos y no hematopoiéticos son idénticas (Coleman, 1966), pero la observación de que la fenilhidrazina no tenía efecto sobre las enzimas hepáticas de ambos genotipos parece indicar que existen diferentes mecanismos fisiológicos de control para la síntesis de ALA-D en tejidos hematopoiéticos y no hematopoiéticos (Coleman, 1966).

Se describió otro gen, el f/f (Margolis y Russell, 1965), que se supuso controla la actividad del ALA-D y modifica el grado de actividad durante la hematopoyesis en tejidos como el bazo y la médula ósea. Resultados posteriores descartaron esta hipótesis (Coleman y col, 1969).

Por otro lado, se identificaron factores genéticos que influirían sobre la estructura del ALA-D, modificando su labilidad al calor. Se supone que estos factores están localizados cerca del gen Lv o están conectados con él, o aún pueden ser idénticos al gen Lv (Coleman, 1971).

III.7.3. Influencia sobre la síntesis de enzima

Además del control genético, algunos factores externos parecen jugar un rol muy definido en la síntesis de la enzima. En cultivos de *Ustilago spherogena*, la síntesis de ALA-D depende de los iones Zn^{2+} en la etapa de traslación (Komai y Neilands, 1968; 1969; Tigier y col, 1970). Si se agrega Zn^{2+} a cultivos que fueron crecidos en presencia de bajas concentraciones de este metal, la actividad aumenta. La adición simultánea de p-fluorfenilhidrazina o actinomicina D durante el desarrollo impide este aumento de actividad (Komai y Neilands, 1968).

En células de *Spirillum itersonii* (Ho y Lascelles, 1971) crecidas en deficiencia de Fe, no se detectó actividad, lo cual llevó a suponer que el Fe podría ser necesario para la síntesis del ALA-D. En células de plantas verdes, el aumento de la actividad del ALA-D bajo la influencia de la luz se debe probablemente a una síntesis de la enzima regulada por la luz más que a una activación de la enzima pre-existente (Schneider, 1970; Stobart y Thomas, 1968).

La administración endovenosa de 4 μ g de estradiol a ratas causaba variaciones irregulares de las actividades de ALA-Sintetasa y Dehidrasa hepáticas por varios días. Cuando se administraba AIA a los animales 5 horas antes de matarlos, ocurrían variaciones similares que ampliaban las curvas de actividad enzimática. Mientras que las variaciones en la sintetasa en respuesta a los estrógenos se deben a cambios en la cantidad de enzima, no se ha podido demostrar que ocurra lo mismo con el ALA-D (Tschudy y col, 1967).

III.7.4. Degradación enzimática

Además de las características uniformes del ALA-D de ratones de ambos fenotipos (Lv^a y Lv^b) la velocidad de turnover también es la misma; la vida media es de 5-6 días (Doyle y Schimke, 1969). Berlin y Schimke (1965) propusieron que las enzimas que limitan la velocidad de una secuencia bioquímica específica deben tener un turnover rápido para adaptarse rápidamente a los requerimientos celulares. El ALA-Sintetasa, que es aparentemente la enzima que controla la velocidad del camino del hemo, tiene

una vida media de 1 hora en hígado de mamíferos, está presente en muy bajas concentraciones (Granick, 1967) y cumple así con los requerimientos antes descritos. Esto aparentemente no se cumple con el ALA-D (Doyle y Schimke, 1969). De todas maneras, la vida media del ALA-D de eritrocitos de pollo y reticulocitos de conejo es de 15 minutos y 1 hora respectivamente (Granick y Mauzeal, 1958).

III.7.5. Funciones limitantes y regulatorias

El ALA-D no es en general una enzima limitante de la síntesis del hemo. En el hígado normal, podría convertir 80 veces más ALA a PBG que el producido normalmente por el ALA-Sintetasa (Tschudy y col, 1965). La razón por la cual la relación ALA-D/ALA-S es normalmente alta se debe probablemente al hecho de que el ALA se forma en la mitocondria y difunde al citoplasma soluble lo cual significa que el ALA se distribuye en un volumen intracelular relativamente grande en concentraciones relativamente bajas antes de que el ALA-D pueda convertirlo en PBG (Tschudy y col, 1965). Es posible que como consecuencia de la baja concentración de ALA citoplasmática sean necesarios niveles altos de ALA-D para asegurar una máxima conversión del ALA formado. De todas maneras debe considerarse que el enorme exceso de ALA-D es quizás mayor *in vitro* que *in vivo* por cuanto es probable que la enzima esté actuando bajo condiciones que no permiten una actividad máxima (Tschudy y col, 1965).

Muchos autores también consideran que la cantidad de enzima presente en citoplasma y la actividad de ALA-D es alta y no limitante (Granick, 1966; 1967; Josephson y col, 1972; Margolis, 1971). Este parece ser el caso particularmente en bacterias fotosintéticas, plantas superiores y animales (Padmanaban y Malathi, 1972). En las células de casi todos los organismos la actividad de ALA-S es considerablemente menor que la del ALA-D. Sin embargo esta relación es la contraria, por ejemplo, en células de *S. itersonii* (Ho y Lascelles, 1971), aún bajo las condiciones de crecimiento más diversas. Así, por ejemplo, la actividad, expresada en nanomoles de producto formado por hora y por mg de proteína, fue de 118 para el ALA-S y 17 para el ALA-D. A pesar de ello parece que aún en este organismo la dehidrasa estaría presente en cantidades no limitantes, y no cumpliría un papel regu

latorio. Comparados con otros organismos, las levaduras y la *Neurospora crassa* son los que presentan la menor actividad de ALA-D (Barreiro, 1967; Muthukrishnan y col, 1972). Esto puede indicar que *in vivo*, dependiendo del organismo, la enzima puede ocasionalmente tener una función regulatoria.

Si en células de hígado de embrión de pollo, la síntesis de porfirinas se induce por AIA *in vitro*, compuestos tales como 3-amino-1,2,4-tiazol y ácido δ -clorolevulínico, que inhiben el ALA-D *in vivo* e *in vitro*, no tienen influencia sobre la velocidad de síntesis, obviamente la inhibición parcial de la enzima no es limitante (Granick, 1966). Sólo en dosis muy altas el 3-amino-1,2,4-tiazol causa una inhibición tan fuerte que el ALA-D asume una función regulatoria (Baron y Tephy, 1969). También en hígados porfíricos, por ejemplo en PAI, la capacidad del ALA-D de convertir el ALA no parece estar inhibida. La inhibición del segundo paso, no limitante, de la síntesis del hemo no necesita volver a discutirse como mecanismo de control de la formación del hemo (Baron y Tephy, 1969).

En contraste con estas observaciones se vio que, en células de *Neurospora crassa* crecidas en condiciones normales y en deficiencia de Fe, las concentraciones de ALA difieren sustancialmente — ALA-S y ALA-D parecen depender marcadamente del contenido de Fe en el medio nutriente — mientras que las concetraciones de PBG y porfirinas no varían o sólo lo hacen en forma poco significativa, aún bajo distintas condiciones (Muthukrishnan y col, 1969). Estos resultados sugieren que el ALA-D de *N. crassa* es el paso limitante de la síntesis del hemo.

La hipótesis de que el ALA-D tiene una función regulatoria en *N. crassa* está apoyada por su vida media relativamente corta *in vivo*. En cultivos de células normales es de aproximadamente 60 min. La curva de la vida media de la enzima de cultivos inducidos por Fe muestra un perfil bifásico; de la primera parte puede determinarse una vida media de 4-5 min; mientras que la segunda parte es comparable con la velocidad de degradación de la enzima normal (Muthukrishnam y col, 1969).

También en *Euglena gracilis*, el ALA-D parece tener un rol regulatorio, ya que tanto Copro III, como Proto IX y hemina la inhiben, siendo su efecto siempre mayor *in vitro* que *in vivo*, si bien cabe la posibilidad de que en estas últimas condiciones

haya problemas de permeabilidad que impidan la acción efectiva del metabolito (Stella, 1977). Los porfirinógenos correspondientes se comportaron de manera análoga, respondiendo su efecto a un tipo de inhibición por feed-back.

III.7.6. Camino metabólico del δ -ALA

Es de esperar que las etapas iniciales o bien aquellas que constituyen puntos de ramificación de las cadenas metabólicas, sean centros de regulación del camino. Shemin (1954) demostró que las porfirinas no son los únicos productos metabólicos del ALA, de manera que el ALA-D se encontraría en un punto importante de ramificación de la cadena biosintética del hemo. A partir del ALA se puede formar también, por deaminación oxidativa, el ácido γ - δ -dioxovalérico (= α -cetoglutárico semialdehído) DOVA, el cual vía α -cetoglutarato y succinato puede entrar al ciclo del ácido cítrico y, a través de los C_1 contribuir a la síntesis de purinas. Se suponía que la enzima que cataliza este paso sería una ALA-transaminasa (Bagdasarian, 1958; Kowalski y col, 1959). Esto, por otro lado, estaría sugiriendo que la actividad del ALA-D podría regular el destino del ALA en el metabolismo intermedio para su uso en la síntesis del hemo o de las purinas. Básicamente, el ciclo propuesto por Shemin, conocido por su nombre, es un camino de degradación de la glicina que propone caminos metabólicos alternativos para disponer del exceso de ALA que no se necesite para la síntesis del hemo o que no puede consumirse para esos fines, cuando el ALA-D está bloqueada. Aproximadamente un 30% del ALA formado entra en el ciclo de Shemin (Figura II.5.) y un 70% se emplea para síntesis de porfirinas (Berlín y col, 1956). Bajo condiciones normales, en hígado de mamíferos, la mayor proporción de glicina se convierte en amino-acetona y se degrada. La dirección del ALA hacia uno u otro de los dos caminos metabólicos posibles está controlada por cambios en la relación de actividad de las dos enzimas que gobiernan ambas reacciones, como consecuencia de modificaciones en el pH, concentración de cofactores, síntesis o degradación de las enzimas, o inhibición de las mismas. Para que tenga lugar la síntesis de porfirinas es necesario, de todos modos, que las moléculas de ALA difundan de la mitocondria. Hasta qué punto el ALA-D tiene una función regulatoria en el proceso de síntesis del

hemo, es todavía una pregunta. Se la describió al ALA-D de *Rp. spheroides* como una enzima alostérica (Nandi y col, 1968), asignándole un papel de menor importancia con respecto a la regulación de la síntesis de porfirinas, y en cuanto a la enzima de mamíferos, no hay aún evidencias firmes como para atribuirle un papel regulador (Doyle, 1971). Hay sin embargo bastantes evidencias que indican que el ALA-D posee en cambio una definida función regulatoria en *Propionibacterium shermanii* y *Euglena gracilis* (Ebon y Tait, 1969; Menon y Shemin, 1967; Stella, 1977).

III.7.7. Mecanismos de retroinhibición

El control por retroinhibición, más conocido por "feed back", tiene particular importancia. Ocurre cuando el producto final de una secuencia metabólica ejerce acción inhibitoria sobre un paso inicial. En este caso, cualquier acumulación del producto subsiguiente disminuye el turnover total y así gobierna el curso total de la cadena enzimática. Con el objeto de estudiar la posible función regulatoria del ALA-D en la cadena biosintética del hemo, se analizó la probable inhibición de la enzima por productos finales de este camino metabólico, tales como hemo y hemina.

En eritrocitos humanos (Calissano y col, 1966), células de *Rp. spheroides* (Burnham y Lascelles, 1963; Nandi y col, 1968), hígado de ratón (Coleman, 1966) y reticulocitos de conejo (London y col, 1964), se apreció inhibición, pero este efecto no se registró en células vegetales (Shetty y Miller, 1969).

No sólo el hemo posee una acción regulatoria en este camino biosintético sino también la protoporfirina IX, que puede inhibir significativamente la formación de PBG a partir de ALA. Este control por hemo y proto del ALA-D, puede considerarse un mecanismo de control normal de la síntesis de porfirinas. Se encontró que la enzima de *N. crassa* se inhibe significativamente por coproporfirina. III (coprogen III) así como con protoporfirina IX (Muthukrishnan y col, 1969). Cuando se examinó en este sentido la enzima de hígado, bazo y sangre de rata y ratón se obtuvieron evidencias de que en muchos casos el coproporfirinógeno III era un inhibidor más potente que la hemina o la protoporfirina IX, excepto para el ALA-D de *Bacillus subtilis* (Rao y col, 1970).

Como se sabe, las reacciones que llevan a la formación de coproporfirinógeno a partir de ALA, tienen lugar en el citoplasma de la célula; en ese aspecto, el ALA-D puede considerarse como la primera enzima de los componentes enzimáticos del citoplasma involucrados en la síntesis del hemo. En este caso, la acción del coprogen III sobre el ALA-D encajaría como un ejemplo típico de control por feed back, dado que el coprogen es, a su vez, el último producto de las porfirinas que se forma en el citoplasma. Esta inhibición regularía el flujo desde y hacia el citoplasma de los productos intermedios de la cadena biosintética, controlando así la velocidad total de la síntesis de hemo (Rao y col, 1970).

III.7.8. Potencial redox celular

La importancia de la concentración de grupos SH para la regulación de la actividad enzimática merece ser mencionada. La significativa disminución de la actividad de ALA-D por etanol *in vivo* sugiere que la actividad enzimática puede estar influenciada por modificaciones en el potencial redox del citoplasma (Moore y col, 1971). El mecanismo podría explicarse como sigue: en la degradación del etanol vía acetaldehído y acetato a acetyl CoA se liberan equivalentes de reducción (NADH). Estos causan un aumento del potencial redox dentro de la célula, que puede influir en el balance entre las formas reducidas y oxidadas de GSH (Lindros y Hillbom, 1969).

De esta forma, la concentración de GSH en sangre aumenta, como se ha demostrado *in vivo*, y si sobrepasa los niveles de máxima activación, puede llegar a inhibir la actividad (Moore y col, 1971).

III.8. Importancia clínica

Las hemoproteínas y las hemoenzimas se caracterizan por el grupo prostético específico: hemo. Recordemos una vez más, que la mayoría de las hemoproteínas participan en el transporte biológico de oxígeno, actuando como transportadores de oxígeno molecular, como la hemoglobina y mioglobina, o cumpliendo funciones oxidativas o transporte de electrones, como enzimas de la

cadena respiratoria, por ejemplo, peroxidasa, catalasa y citocromos. Si consideramos los alcances finales de las consecuencias fisiológicas que pueden producir los disturbios en la síntesis del hemo, que resultarían por ejemplo, del bloqueo del ALA-D, se hace evidente la importancia de esta enzima en la cadena biosintética del hemo.

III.8.1. Método de ensayo enzimático

Aún cuando ya en 1950 se habían desarrollado métodos para la determinación del ALA-D, fue después de las publicaciones de Bonsignore y col (1965 a y b, 1966), que creció el interés en el ensayo de esta enzima como posible criterio de diagnóstico, muy en particular para los casos de intoxicación con Pb. Este método se basa en los trabajos de Gibson y col (1955) y Granick y Mauzerall (1958). La determinación enzimática aplicada por Moore y col (1971) es en principio como sigue:

La actividad del ALA-D de eritrocitos humanos se determina midiendo la formación de PBG a partir de ALA. Deben usarse recipientes de vidrio libre de Pb. La sangre venosa heparinizada se centrifuga (1000 g, 4 °C, 20 min), y el plasma y los glóbulos blancos se descartan. Los eritrocitos se lavan con solución de KCl 0,15 M, se centrifugan (1000 g, 10 min) y se suspenden en solución de KCl; las células así suspendidas se cuentan. Se centrifugan nuevamente, se retira el KCl y se agrega agua destilada para hemolizar los eritrocitos. Luego de 20 min se agrega KCl (0,6 M) para restaurar la isotonicidad. Se calientan tubos de Thunberg a 37 °C, conteniendo GSH, ALA y buffer fosfato pH 6,8. Se agrega una preparación enzimática también calentada y se vacían los tubos de Thunberg. La reacción se detiene por adición de TCA (0,3 M) y se mide el PBG endógeno. Para determinar el PBG formado por ALA-D a partir de ALA, los otros tubos se incuban a 37 °C por una hora, luego la reacción se detiene por agregado de TCA. Luego de centrifugar (1000 g) se agrega reactivo de Ehrlich al sobrenadante y se centrifuga nuevamente. Se lee la densidad óptica del sobrenadante a 553 nm entre 15 y 45 minutos. En relación con el coeficiente de absorción molar del PBG ($6,8 \times 10^4$), la actividad del ALA-D se define como nmoles de PBG formados por 10^{10} GR por hora. El margen de error del método está entre $0,55 \pm 0,25\%$.

Recientemente, se ha descrito un método para la determinación de la actividad de ALA-D eritrocitaria humana que utiliza cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Crowne y col, 1981). Se usa ALA como sustrato, y el PBG formado se determina por cromatografía en fase reversa con formación de par iónico sobre Hypersil-SAS (alquil sílica de cadena corta) con metanol-agua (22:78, v/v) en presencia de Pic B7 (ácido 1-heptanosulfónico 0,005 M buffereado a pH 3,5) como fase móvil. El PBG se separa efectivamente del ALA y del standard interno 2-metil-3-carbometoxi-4-(3-ácido propiónico) pirrol. Utilizando este método se encontró un valor normal de $17,50 \pm 3,84 \mu\text{mol/lGR/min}$.

El valor normal de ALA-D determinado por varios autores está en el rango de 100 a 180 x $10^{-3} \mu\text{mol}$ de PBG por ml de GR por hora de incubación. La actividad difiere significativamente entre los sexos, siendo mayor en mujeres que en hombres (Haeger-Arönsen y col, 1971); no hay en cambio, mayores diferencias entre niños y adultos (Haeger-Arönsen y col, 1971). La determinación de la actividad enzimática en eritrocitos de una persona sana permanece constante a lo largo de un período de 6 meses (Burch y Siegel, 1971).

La actividad del ALA-D de eritrocitos lavados y sangre entera es la misma. En suero y glóbulos blancos no hay actividad medible. La actividad en sangre venosa y sangre capilar de un mismo sujeto sano es la misma (Weissberg y col, 1971).

Nikkanen y col (1972) observaron una pérdida de actividad del ALA-D eritrocitaria del 20% si la sangre entera se guardaba 24 hs. a 5 °C y del 30% luego de 48 horas.

Prpic-Majic y col (1973) demostraron que después de horas, se conservaba el 91% de la actividad inicial de la sangre entera mantenida a 1°C y el 87% luego del mismo período a 25 °C.

Cuando la sangre se guardaba hemolizada a 5°C por 24 horas, se perdía el 30% de la actividad inicial y el 40% luego de 48 horas. Esto no sucedía con sangre de trabajadores expuestos al Pb. Esto demuestra que el ALA-D afectada por el Pb es más estable comparada con el ALA-D normal. El ALA-D eritrocitaria es más estable cuando el hemolizado se guarda a temperaturas cercanas al 0 (5 °C) que en congelador (- 20 °C) (Tomokuni, 1976).

III.8.2. Enfermedades hepáticas

En diferentes enfermedades hepáticas se observaron cambios en la actividad de ALA-D. En cirrosis hepática, particularmente en los casos avanzados (Iwanow, 1968, Rubino y col, 1960), en degeneración hepática lenticular (Iwanow, 1968) y en hepatitis (Rubino y col, 1960) la actividad enzimática en GR está marcadamente reducida. Sin embargo, Iwanow (1968) encontró que la actividad era normal en 10 pacientes con hepatitis crónica. Esta disminución de actividad - cuyo mecanismo no es claro-aparentemente no tiene importancia para diagnóstico.

III.8.3. Tirosinemia

La Tirosinemia hereditaria o tirosinosis es una enfermedad metabólica, consecuencia de una falla en el metabolismo de la tirosina, posiblemente insuficiencia o ausencia de la p-hidroxifenilpirúvico oxidasa hepática. Se caracteriza por una concentración elevada de tirosina en plasma y masiva tirosiluria. En esta enfermedad muchos de los síntomas son similares a los de la Porfiria Aguda Intermitente; también se encuentran en la orina de los pacientes elevadas cantidades de succinilacetona y ALA, en tanto que la excreción de PBG y porfirinas es normal, lo cual sugirió un bloqueo a nivel del ALA-D. La determinación del ALA-D en glóbulos rojos demostró que la actividad de esta enzima en tirosinemia hereditaria está significativamente reducida tanto durante los períodos de remisión como durante los ataques agudos. La medida del ALA-D, así como los niveles de ALA y succinil acetona, se encuentran siempre disminuída y aumentados respectivamente en los pacientes con la enfermedad hereditaria y son elementos que contribuyen al diagnóstico (Strife y col, 1977; Christensen y col, 1981).

III.8.4. Enfermedades renales

En 9 pacientes con nefritis crónica y pyelonefritis, desórdenes que involucran una severa descompensación renal y un avanzado grado de retención de nitrógeno, se encontró una marcada disminución de actividad de ALA-D en eritrocitos (Iwanov, 1968). En cambio, no se encontraron desviaciones en nefropatías crónicas. En 15 casos de nefropatías endémicas, el ALA-D mostró

una ligera tendencia a disminuir, pero las diferencias con los valores normales no eran significativas. En este caso también, el mecanismo permanece aún sin explicación. Tampoco se conocen detalles acerca del rol que juega el ALA-D en la patogénesis de la anemia nefrogénica (Iwanov, 1968).

III.8.5. Tumores

Los ensayos de actividad de ALA-D en varios tumores del tracto digestivo humano (por ejemplo, carcinoma cirrótico gástrico, carcinoma de colon, adeno-carcinoma de estómago, carcinoma rectal y otros) revelaron una significativa disminución de la actividad enzimática comparada con tejidos normales (Rasetti y col, 1967); de todas maneras, en dos casos de tumores de pulmón y carcinoma de útero, la síntesis de PBG parece ser mayor que en tejidos normales (Rasetti y col, 1967).

Los leucocitos patológicos de pacientes con leucemia mielocítica aguda y crónica presentaban una actividad de ALA-D 3 a 5 veces menor que los granulocitos y linfocitos maduros normales (Takaku y Wada, 1968).

En experimentos con animales se describió una disminución creciente de la actividad de la dehidrasa hepática en presencia de un tumor o luego de la inoculación de células tumorales (Cookson y Rimington, 1953; Russell y Coleman, 1963); también en las células tumorales se encontró un nivel de ALA-D notablemente bajo. La actividad de citocromos, citocromooxidasa y catalasa marcadamente reducida en células tumorales sugieren una posible conexión (Tschudy y col, 1964).

Tampoco se ha podido dilucidar si el mecanismo responsable de la actividad baja de ALA-D tiene una base viral o bacteriana o se debe a una toxohormona (Tschudy y col, 1964).

La inoculación con virus de Friend (FV), que en ratones induce leucemia y policitemia, causa, luego de un período de latencia , un aumento considerable de la actividad de ALA-D en bazo e hígado, probablemente como resultado de un aumento de los precursores eritroides, mientras que en la médula ósea, la actividad disminuye gradualmente. En este caso, la enzima parece ser un parámetro apropiado de la actividad eritropoietica (Tengerdy, 1966).

III.8.6. Alcohol

La acción del etanol sobre la actividad del ALA-D en el cuerpo humano fue investigada por Moore y col (1971). A medida que aumenta el nivel sanguíneo de alcohol luego de su ingestión, la actividad enzimática disminuye bruscamente y prácticamente coincide el momento de la mayor concentración de alcohol con el menor nivel de actividad. Luego de 10 horas se recupera el valor normal.

III.8.7. Porfirias

Parecería que en las diferentes formas de porfirias humanas hereditarias, el ALA-D no jugaría un rol importante.

En la mayoría de los casos, el defecto enzimático primero está localizado a nivel de otras enzimas, y los cambios en la actividad de ALA-D son sólo secundarios.

En la porfiria congénita, se encontró además de una deficiencia de isomerasa, un aumento en la concentración de ALA-D en eritrocitos. Durante los ataques agudos de pacientes con Coproporfirina hereditaria, las actividades del ALA-S y ALA-D hepática estaban aumentadas 5 y 2 veces respectivamente (Kaufman y Marver, 1970); en la sangre de estos mismos pacientes, el ALA-D doblaba su actividad durante los ataques agudos. Como en estas condiciones también aumentaba la excreción urinaria de ALA y PBG, es probable que el incremento en la actividad de ALA-D fuera una consecuencia de una mayor concentración de sustrato, y no tuviera en realidad una relación directa con la patogenia de la enfermedad (Mc Intyre y col, 1971).

En PCT, la actividad de ALA-D está dentro del rango normal (Kaufman y Marver, 1970):

En pacientes con PAI se encontró un aumento de actividad también acompañado de una elevada excreción urinaria de ALA y PBG (Nakao y col, 1966; Gibson y Goldberg, 1970).

En la porfiria experimental inducida por Sedormid, AIA o DDC, similar a la PAI humana, la cantidad de ALA eliminada en orina mostraba buena correlación con la actividad enzimática (Tancioni y col, 1964). Sin embargo, estos resultados no consti

tuyen todavía un elemento útil con fines terapéuticos o de diagnóstico.

Doss y col (1980) describieron un nuevo tipo de porfiria hepática aguda, con ALA-D muy disminuída, y repetidas manifestaciones agudas intermitentes. Los dos pacientes estudiados presentaban una elevada excreción urinaria de ALA, un leve aumento de PBG y un gran aumento de porfirinas, principalmente coproporfirina.

La actividad del ALA-D en ambos casos era inferior al 1% de los valores normales, sin encontrarse plomo en sangre, orina ni médula ósea, ni tampoco aminoácidos en orina y plasma.

Además, el ALA-D estaba disminuída en casi todos los miembros de la familia.

De estos datos puede concluirse que no existe una causa "tóxica" exógena para esta porfiria, sino que se trata de un nuevo tipo enzimático de porfiria hepática aguda con manifestaciones intermitentes, clínicamente análoga a la PAI.

III.8.8. Anemia

Los disturbios en la síntesis del hemo y porfirinas son de importancia causal para el desarrollo de ciertas anemias con todos sus síntomas. Como enzima esencial de la cadena biosintética, el ALA-D contribuye a la patogénesis de la anemia ya que se encuentra influída por factores asociados a este desorden, pero no constituye un sitio de acción primario.

Las medidas de actividad de ALA-D en eritrocitos de pacientes con anemia por deficiencia de hierro muestran resultados contradictorios. Algunos autores (Battistini y col, 1971; Lichtman y Feldman, 1963) encontraron actividades normales, otros aumentadas (Steiner y col, 1964) y otros disminuídas (Rubino y col, 1960) con excreción aumentada de ALA en orina, disminuída de PBG, y un aumento de protoporfirina en sangre periférica; se sabe que la protoporfirina puede reducir la formación de PBG por feedback negativo. En base a estas ideas, se sugirió que la disminución de la actividad del ALA-D reflejaría el funcionamiento de un mecanismo regulatorio destinado a proteger el organismo de un exceso de porfirinas (Heilmeyer, 1963). La excreción de

ALA y PBG en orina de 24 horas, antes y después del tratamiento con hierro indicaban una reducción de la actividad del ALA-D en deficiencia de Fe, pero posteriores estudios *in vitro* no confirmaron estos resultados. Es posible que en deficiencia de hierro *in vivo*, la concentración de cisteína y otros carriers de grupos SH, esté disminuída. Al tratamiento con hierro sigue un aumento rápido y constante de la actividad enzimática, asociado con un aumento de reticulocitos (Rubino y col, 1960).

En sangre de pacientes con anemia hemolítica, en especial las anemias con células en hoz y talasemia, y anemias inmuno hemolíticas, se encontraron valores aumentados de ALA-D, probablemente como resultado del aumento de reticulocitos por incremento de la eritropoiesis (Rubino y col, 1960). En cambio, en la síntesis de hemo a partir de ALA, y especialmente en la formación de PBG *in vitro*, no hubo disminución de la actividad enzimática (Vavra y col, 1964).

En talasemia mayor, Steiner y col (1964) encontraron que el ALA-D estaba reducida a la cuarta parte de su valor normal; sin embargo, no pudo establecerse una relación directa entre los niveles de hemoglobina y la actividad enzimática. Los mismos autores describieron un caso de talasemia mayor en el cual la terapia por desferrioxamina B durante varios meses llevó a una recuperación de los niveles de ALA-D. La inhibición de ALA-D estaría de acuerdo con los hallazgos de un marcado aumento de ALA urinario y protoporfirina eritrocitaria (Lyberatos y col, 1972); sin embargo, esta idea no se pudo demostrar. Podría ser que el turnover del ALA estuviera aumentado hacia el ciclo de Shemin (Figura II.5.), para la formación de sustancias nucleares, quizás en reticulocitos.

En el caso de anemias hemolíticas, además de la anomalía de la globina, es notable la disminución en la síntesis de PBG, pero no pudo demostrarse la existencia de una definida enzimopatía (Prato y col, 1970). En las anemias hemolíticas inducidas por fenilhidrazina, la actividad de ALA-D estaba siempre marcadamente aumentada (Coleman, 1966; Gibson y col, 1955).

En pacientes con artritis reumatoidea y anemia se encontró actividad aumentada de ALA-D en eritrocitos y una excreción excesiva de PBG en orina; no había diferencias significativas entre los reticulocitos de adultos sanos y pacientes con artri-

tis reumatoidea (Johansson y Strandberg, 1972).

Mientras que los valores de ALA-D en anemia asociada con artritis y carcinomatosis en algunos pacientes no difieren de los normales, las actividades estaban significativamente aumentadas en sangre de pacientes con anemia macrocítica con deficiencia de vitamina B₁₂ y ácido fólico, pero no se encontró una correlación entre la actividad de ALA-D y el grado de anemia o la concentración sérica de B₁₂ y ácido fólico. Cuando se administraba B₁₂, la actividad enzimática aumentaba junto con la reticulocitosis (Battistini y col, 1971). Estos resultados son contradictorios con los de Rubino y col (1960), quienes en casos de anemias macrocíticas encontraron una disminución constante del contenido de ALA-D en eritrocitos. La actividad enzimática también está reducida en anemias sideroblásticas sensibles a la piridoxina. Esto lleva a concentraciones relativamente altas de ALA y bajas de PBG en eritrocitos. En estas anemias, los ensayos *in vitro*, basados en el hecho de que la vitamina B₆ es un potente activador, no sólo de la síntesis de ALA sino también de la formación de PBG, pueden ser un indicador útil de la respuesta a la terapia con B₆ en anemia. Parece que la reactivación del ALA-D es un factor importante en la evaluación del efecto terapéutico (Heilmeyer, 1963, 1967).

Debe mencionarse la anemia transitoria siderocítica severa que se manifiesta en el período fetal en los ratones de genotipo f/f (Margolis y Russell, 1965); los animales adultos del mismo genotipo son hematológicamente normales, pero muestran una marcada disminución de la actividad de ALA-D en hígado, bazo y riñón, comparable con los ratones Lv^b (Coleman, 1966). Por tratamiento con fenilhidrazina, que induce anemia hemolítica con stress hematopoiético, la actividad de ALA-D aumenta marcadamente en el bazo de animales normales, pero sólo ligeramente en bazo de ratones f/f (Margolis y Russell, 1965). Se sugirió que la deficiencia enzimática genética familiar y la incapacidad de responder a la crisis hematopoiética con un aumento adecuado de la actividad enzimática, son las causas de la severa anemia fetal con su velocidad extrema de formación de sangre "de novo" (Margolis y Russell, 1965; Coleman y col, 1969), además de que el gen f influye sobre un mecanismo regulatorio, que cuando aumenta el requerimiento de Hb permite normalmente el incremento de la actividad de ALA-D en tejidos hematopoiéticos, y de esta

manera juega un rol en el control de actividad de ALA-D, especialmente en bazo y médula ósea (Coleman, 1966). Luego se demostró que los genes Lv y f, contrariamente a lo que se había sugerido en un principio, no están ligados uno a otro. Se aceptó que los niveles de ALA-D sólo están controlados por el gen Lv y que el gen f probablemente actúa controlando la velocidad de proliferación de las células hematopoiéticas (Coleman y col, 1969).

III.9. Factores Ambientales: Metales

La información existente acerca de la inhibición del ALA-D *in vitro* por iones inorgánicos distintos del plomo, ha sido contradictoria.

Thompson y col (1977) realizaron algunas observaciones interesantes con respecto a las determinaciones de ALA-D eritrocitaria. Dichos autores llegaron a la conclusión de que el ALA-D de glóbulos rojos es un indicador de la concentración total de iones metálicos en la sangre. Influyen en su actividad elementos esenciales como el cobre, que la inhibe y el zinc, que la activa. Las proteínas plasmáticas protegen a la enzima de la inhibición y de la activación. Dicho efecto depende de la afinidad de los distintos metales por estas proteínas, pero también de las concentraciones relativas de los mismos.

III.9.1. Cadmio

Kench y Gubb (1970) observaron que la actividad de ALA-D se estimula a determinadas concentraciones de cadmio tanto *in vivo* como *in vitro*.

En cambio, según Wada y col (1972) el ALA-D se inhibe completamente *in vitro* con 0,1 mM de cadmio.

Wilson y col (1972) en base a estudios con hígado bovino llegaron a la conclusión de que el cadmio puede activar o inhibir el ALA-D, dependiendo de la concentración del metal.

Para Abdulla y Haegen-Arönsen (1973) el cadmio es un inhibidor del ALA-D.

Davis y Avram (1978) encontraron que en hemolizados de sangre humana entera, el cadmio se comporta como un activador o un

inhibidor del ALA-D según la concentración empleada. Así, a 4 μM de cadmio se producía una estimulación máxima de 134% con respecto al control y a mayores concentraciones de cadmio se observó una inhibición progresiva de la actividad del ALA-D. A $8 \times 10^{-5}\text{M}$ la enzima se inhibió un 50% mientras que la concentración de plomo necesaria para producir igual grado de inhibición era de sólo $2 \times 10^{-6}\text{M}$.

Si bien *in vitro* el cadmio es un inhibidor del ALA-S, *in vivo* estos efectos no se ponen claramente de manifiesto debido a que el metal es captado por las metalotioneínas, proteínas de bajo peso molecular, cuya síntesis es inducida por el cadmio, y que luego capturan al metal tóxico.

En hígado y riñón, órganos con las más altas concentraciones de metalotioneínas, la actividad del ALA-D se modifica muy poco a lo largo de las experiencias de intoxicación con cadmio, a pesar de que en muchas de ellas se alcanzan, en dichos órganos, concentraciones del metal que, *in vitro*, son netamente inhibitorias.

En bazo y glóbulos rojos, en algunos casos se producen descensos significativos de la actividad, pero no se observa una correlación entre dosis administrada y grado de inhibición; otras veces, el cadmio tampoco inhibe las enzimas de estos tejidos.

Se ha tratado de encontrar las causas del comportamiento irregular del metal.

La metalotioneína inducida por el cadmio también une zinc. Se trata así de una cadmio, zinc-metalotioneína.

El zinc es un elemento esencial que entra en la composición de las membranas celulares y también es necesario para estabilizar o aumentar la actividad de enzimas, entre ellas el ALA-D. De modo que pueden entrar en juego efectos complejos.

Algunas experiencias de administración conjunta cadmio-zinc apoyarían un efecto activador del metal sobre el ALA-D, ya que al administrar conjuntamente cadmio en dosis más altas que las habituales de 0,6 mg/kg peso, y zinc en dosis suficientemente elevadas como para inducir la formación de metalotioneínas, se registraron aumentos significativos de la actividad del ALA-D, no sólo en bazo y glóbulos rojos, sino también en hígado

y riñón.

III.9.2. Mercurio

El mercurio, otro contaminante del medio ambiente, ha resultado ser otro inhibidor del ALA-D, tanto *in vivo* como *in vitro* (Cartasegna y col, 1968; Gibsón y col, 1955); en este último caso, su acción es revertida por GSH (Weissberg y Voytek, 1974).

En cerca de la mitad de los trabajadores que habían estado en contacto con vapores de mercurio, la actividad de ALA-D eritrocitaria estaba marcadamente reducida, aunque en la mayoría de los casos, los niveles urinarios de ALA y eritrocitarios de GSH estaban dentro del rango normal (Wada y col, 1969). El período de exposición y los niveles urinarios de Hg mostraban una estrecha correlación con el descenso en la actividad de ALA-D. De esto se concluye que el mercurio tiene algún efecto *in vivo* sobre el metabolismo de las porfirinas, pero los disturbios son demasiado leves para ocasionar una elevada excreción de ALA y porfirinas en orina (Wada y col, 1969).

In vitro, los niveles de la enzima se ven disminuidos aún a bajas concentraciones de mercurio (Roels y col, 1975).

III.9.3. Plomo

El Capítulo IV está dedicado en especial a la intoxicación por este metal, incluyendo lo referente a su acción sobre esta enzima.

REFERENCIAS

- Abdulla, M. & Haeger-Arönsen, B. (1973) *Int. Res. Commun. Syst.* 73, 8.
- Bagdasarian, M. (1958) *Nature* 181, 1399.
- Baron, J. & Tephly, T.R. (1969) *Molecul. Pharmacol.* 5, 10.
- Barreiro, O.L.C. de (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 139, 479.
- Barreiro, O.L.C. de (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 178, 412.
- Batlle, A.M. del C.; Ferramola, A.M. & Grinstein, M. (1967) *Biochem. J.* 64, 80.
- Batlle, A.M. del C. & Stella, A.M. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 861.
- Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M.; Ferramola, A.M.; Sopena, Y. Wider de Xifra, E.A. & Sancovich, H.A. (1978) *Int. J. Biochem* 9, 401.
- Battistini, U.; Morrow, J.J.; Ginsburg, D.; Thompson, G.; Moore, M.R. & Goldberg, A. (1971) *Brit. J. Haematol.* 20, 177.
- Berlin, N.I.; Neuberger, A. & Scott, J.J. (1956) *Biochem. J.* 64, 80.
- Berlin, C.M. & Schimke, R.T. (1965) *Molecul. Pharmacol.* 1, 149
- Bogorad, L. & Granick, S. (1953) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 39, 1176.
- Bonsignore, D. (1966) *Med. Lavoro* 56, 647.
- Bonsignore, D.; Calissano, P. & Cartasegna, C. (1965 a) *Med. Lavoro* 56, 199.
- Bonsignore, D.; Calissano, P. & Cartasegna, C. (1965 b) *Med. Lavoro* 56, 727.
- Brumm, P.J. & Friedmann, H.C. (1981) *B.B.R.C.* 102, 854.
- Burch, H.B. & Siegel, A.L. (1971) *Clin. Chemistry* 17, 1038.
- Burnham, B.F. & Lascelles, J. (1963) *Biochem. J.* 87, 462.
- Calissano, P.; Bonsignore, D. & Cartasegna, C. (1966) *Biochem. J.* 101, 550.
- Carell, E.F. & Kahn, J.S. (1964) *Arch. Biochem. Biophys.* 108, 1

- Cartasegna, C.; Vergano, C. & Arboino, V. (1968) *Med. dell Lavoro* 59, 419.
- Coleman, D.L. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 5511.
- Coleman, D.L. (1971) *Science* 173, 1245.
- Coleman, D.L.; Russell, E.S. & Levin, E.Y. (1969) *Genetics* 61, 631.
- Collier, H.B. (1971) *Clin. Biochem.* 4, 222.
- Cookson, G.H. & Rimington, C. (1953) *Nature*, 171, 875.
- Crowne, H.; Lim, C. & Samson, D. (1981) *J. Chromatogr.* 223, 421.
- Chandrika, S.R.; Chandra Kumar, C. & Padmanaban, G. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 607, 331.
- Cheh, A. & Neilands, J.B. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 1060.
- Christensen, E.; Jacobsen, B.B.; Gregersen, N.; Hjeds, H.; Pedersen, J.B.; Brandt, N.V. & Baekmark, V.B. (1981) *Clin. Chim. Acta* 116, 331.
- Davis, J.R. & Avram, M.J. (1978) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 44, 181.
- De Matteis, F. & Gibbs, A. (1972) *Biochem. J.* 126, 1149.
- Doss, M.; von Tiepermann, R. & Schneider, J. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 823.
- Doyle, D. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5449.
- Doyle, D. & Schimke, R.T. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5449.
- Dresel, E.I.B. & Falk, J.E. (1953) *Nature* 172, 1185.
- Ebert, P.S.; Hess, R.A.; Frykholm & Tschudy, D.P. (1979) *BBRC* 88, 1382.
- Ebon, J.G. & Tait, G.H. (1969) *Biochem. J.* 111, 573.
- Falk, J.E.; Dresel, E.I.B. & Rimington, C. (1953) *Nature* 172, 292.
- Fowler, I.H.; Till, J.E.; Mc Culloch, E.A. & Siminovitch, L. (1967) *Brit. J. Haemat.* 13, 256.
- Freshney, R.I. & Paul, J. (1971) *J. Embryol. Exp. Morph.* 26, 313.

- Gibson, S.L.M. & Goldberg, A. (1970) Clin. Science 38, 63.
- Gibson, K.D.; Neuberger, A. & Scott, J.J. (1955) Biochem. J. 61, 618.
- Granick, S. (1954) Science 120, 1105.
- Granick, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 1359.
- Granick, S. (1967) In "Biochemistry of Chloroplasts" Vol 2. Ed. T.W. Goodwin - N.Y. Academic Press, p. 373.
- Granick, S. & Levere, R.D. (1964) Progress in Hematol. 4, 1.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1119.
- Granick, S. & Urata, G. (1963) J. Biol. Chem. 238, 821.
- Gurba, P.E.; Sennett, R.F. & Kobes, R.D. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 150, 130.
- Haeger-Arönsen, B.; Abdulla, M. & Fristedt, B.I. (1971) Arch. Environ. Health 23, 440.
- Heilmeyer, L. (1963) Münch. Med. Wschr. 105, 277.
- Heilmeyer, L. (1967) Blut 16, 1.
- Heyningen, S. van & Shemin, D. (1970) Fed. Proc. 29, 937.
- Heyningen, S. van & Shemin, D. (1971 a) Biochemistry 10, 4676.
- Heyningen, S. van & Shemin, D. (1971 b) Biochem. J. 124, 68 P.
- Ho Y.K. & Lascelles, J. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 144, 734.
- Hutton, J.J. & Coleman, D.L. (1969) Biochem. Genetics 3, 517.
- Iodice, A.A.; Richert, D.A. & Schulman, M.P. (1958) Fed. Proc. 17, 248.
- Iwanow, E.D. (1968) Folia Haem. 89, 233.
- Johansson, S.V. & Strandberg, P.O. (1972) J. Clin. Path. 25, 159.
- Jordan, P. & Seehra, J. (1980) FEBS Letters 114, 283.
- Josephson, A.S.; Levere, R.D.; Lowenthal, J.; Swerdlow, F. & Grinsberg, M. (1972) Blood 39, 568.
- Kaufman, L. & Marver, H.S. (1970) New Engl. J. Med. 283, 954.
- Kench, J.E. & Gubb, P.J.D. (1970) Biochem. J. 120, 27.
- Komai, H. & Neilands, J.B. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 124, 456.

- Komai, H. & Neilands, J.B. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 171, 311.
- Kowalski, E.; Danciewicz, A. & Szot, Z. (1959) *Proceedings of the IV International Congress of Biochemistry. Viena 1950. N.Y. Pergamon Press 1959, p. 46.*
- Lartillot, S. & Baron, C. (1967) *Bull.Soc.Chim. Biol.* 49, 81.
- Lichtman, H.C. & Feldman, F. (1963) *J. Clin. Invest.* 42, 830.
- Lindros, K.O. & Hillbom, M.E. (1969) *Life Science* 8, 1017.
- London, I.M.; Bruns, G.P. & Karibian, D. (1964) *Medicine* 43, 789.
- Lyberatos, C.; Chalevelakis, G.; Platis, A.; Stathakis, N.; Panani, A. & Gardikas, C. (1972) *Acta Haemat.* 47, 164.
- Margolis, F.L. (1971) *Arch. Biochim. Biophys.* 145, 373.
- Margolis, F.L. & Russell, E.S. (1965) *Science* 150, 496.
- Marver, H.S.; Collins, A.; Tschudy, D.P. & Rechcigl, M. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 4323.
- Mc Intyre, N. ; Pearson, A.J.G.; Allan, D.J.; Craske, S.; West, G.M.L.; Moore, M.R.; Beattie, A.D.; Paxton, J. & Goldberg, A. (1971) *Lancet* 1, 560.
- Menon, I.A. & Shemin, D. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 304.
- Moore, M.R.; Beattie, A.D.; Thompson, G.G. & Goldberg, A. (1971) *Clin. Science* 40, 81.
- Muthukrishnan, S.; Padmanaban, G. & Sarma, P.S. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4241.
- Muthukrishnan, S.; Malathi, K, & Padmanaban, G. (1972) *Biochem. J.* 129, 31.
- Nakao, K.; Wada, O. & Kitamura, T. (1966) *Nature* 210, 838.
- Nakao, K.; Wada, O. & Yano, Y. (1968) *Clin. Chim. Acta* 19, 319.
- Nandi, D.L. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 142, 157.
- Nandi, D.L.; Baker-Cohen, K.F. & Shemin, D. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1224.
- Nandi, D.L. & Waygood, E.R. (1967) *Can. J. Biochem.* 45, 327.

- Nandi, D.L. & Shemin, D. (1968 a. J. Biol. Chem. 243, 1231.
- Nandi, D.L. & Shemin, D. (1968 b; J. Biol. Chem. 243, 1236.
- Narisawa, K. & Kikuchi, G. (1966) Biochim. Biophys. Acta 123, 596.
- Nikanen, J.; Hernberg, S. & Tola, S. (1972) Work Environ Health 9, 46.
- Onisawa, J. & Labbe, P.F. (1962) Biochim. Biophys. Acta 56, 618.
- Padmanaban, G. & Malathi, K, (1972) Biochem. J. 128, 27 P.
- Prato, V.; Gallo, E.; Ricco, G.; Mazza, U.; Bianco, G. & Lehmann, H. (1970) Brit. J. Haemat. 19, 105.
- Prpic-Majic, D.; Mueller, P.K.; Lew, V.C. & Twiss, S. (1973) Am. Ind. Hyg. Assoc. J. 34,315.
- Rao, H.R.S.; Padmanaban, G.; Muthukrishnan,S. & Sarma, P.S. (1970) Indian J. Biochem. 7, 132.
- Rasetti, L.; Rubino, G.F. & Drago, W. (1967) Panminerva Med. 9, 132.
- Rimington, C. & Booij, H.L. (1957) J. Biochem. 65, 111.
- Roels, G.; Buchet, J.; Lawerys, R. & Jonnet, A. (1975) Brit. J. Ind. Med. 32, 181.
- Rubino, G.F.; Teso, G. & Rasetti, L. (1960) Acta Haemat. 24, 300.
- Russell, R.L. & Coleman, D.L. (1963) Genetics 48, 1033.
- Seehra, J.; Gore, M.; Chaudhry, A. & Jordan, P. (1981) Eur. J. Biochem. 114, 263.
- Schneider, H.A.W. (1970) Zschr. Pflanzenphysiol. 62, 328.
- Schmid, R. & Shemin, D. (1955) J. Clin. Invest. 34, 911.
- Shemin, D. (1954) Harvey Lectures 50, 258.
- Shemin, D. (1962) Method. Enzymol. 5, 883.
- Shemin, D. (1976) Phil. Trans. R. Soc. London B. 273, 109.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1945) J. Biol. Chem. 159, 567.
- Shetty, A.S. & Miller, G.W. (1969) Biochem. J. 114, 331.
- Steer, B.T. & Gibbs, M. (1969) Plant. Physiol. 44, 781.

- Steiner, M.; Baldini, M. & Dameshek, W. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. 119, 548.
- Stella, A.M. (1977) Tesis doctoral, UBA.
- Stobart, A.K. & Thomas, D.R. (1968) Phytochemistry 7, 1313.
- Strife, C.; Zuroweste, E.L.; Emmett, E.A.; Finelli, U.N.; Petering, H.G. & Berry, H.K. (1977) J. Pediat. 90, 400.
- Tancioni, A.; Tigier, H.A. & Grinstein, M. (1964) Biochem. Pharm. 13, 1095.
- Takaku, F. & Wada, O. (1968) Cancer Res. 28, 1250.
- Tengerdy, R.P. (1966) Cancer Res. 26, 312.
- Thompson, J.; Jones, D.D. & Beasley, W.H. (1977) Br. J. Ind. Med. 34, 32.
- Tigier, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Locascio, G. (1968) Biochim. Biophys. Acta 151, 300.
- Tigier, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Locascio, G. (1970) Enzymologia 38, 43.
- Tomio, J.M.; Tuzman, V. & Grinstein, M. (1968) Europ. J. Biochem. 6, 84.
- Tomokuni, K. (1976) Clin. Chim. Acta 69, 547.
- Tschudy, D.P.; Waxman, A. & Collin, A. (1967) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 58, 1944.
- Tschudy, D.P.; Collins, A.; Caughey, W.S. & Kleinspahn, G.G. (1966) Science 131, 1380.
- Tschudy, D.P.; Welland, F.H.; Collins, A. & Rechcigl, M. (1964) Cancer Res. 24, 2033.
- Tschudy, D.P.; Perlroth, M.G.; Marver, H.S.; Collins, A.; Hunter, G. & Rechcigl, M. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 841.
- Tschudy, D.P.; Hess, R.A. & Frykholm, R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9915.
- Tsukamoto, K.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 294.
- Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1979) Biochim. Biophys. Acta 570, 167.
- Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980) Int. J. Biochem. 12, 751.

- Vavra, J.D.; Mayer, V.K. & Moore, C.V. (1964) J. Lab. Clin. Med. 63, 736.
- Wada, O; Toyokawa, K.; Suzuki, T.; Suzuki, S.; Yano, Y. & Nakao, K. (1969) Arch. Environm. Health 19, 485.
- Wada, O.; Ono, I.; Maru, R.; Toyokawa, K. (1972) Ind. Health, 10, 11.
- Waldenström, J. (1934) Acta Med. Scand. 83, 281.
- Weissberg, H. & Voytek, A. (1974) Biochim. Biophys. Acta 364, 304.
- Weissberg, J.B.; Lipschutz, F. & Oski, F.A. (1971) New Engl. J. Med. 284, 565.
- Westall, R.G. (1952) Nature 170, 614.
- Wilson, M.L.; Iodice, A.A.; Schulman, M.P. & Richert, D.A. (1959) Fed. Proc. 18, 352.
- Wilson, E.L.; Burger, P.E. & Dowdle, E.B. (1972) Eur. J. Biochem. 29, 563.
- Wu, W.H.; Shemin, D.; Richards, K.E. & Williams, R.C. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. - U.S.A. 71, 1767.
- Yamasaki, H. & Moriyama, T. (1971) Biochim. Biophys. Acta 227, 698.

CAPITULO IV

INTOXICACION POR PLOMO

IV.1. Introducción	116
IV.2. Vías de intoxicación por Pb	117
IV.3. Fuentes de intoxicación	117
IV.4. Criterios clínicos	119
IV.4.1. Síndrome neuropsiquiátrico	120
IV.4.2. Síndrome renal	121
IV.4.3. Intoxicación por Pb y cáncer	121
IV.4.4. Efecto del Pb en el período fetal y en la infancia	122
IV.5. Criterios de laboratorio	123
IV.6. Metabolismo del Pb en el hombre	124
IV.6.1. Metabolismo normal	124
IV.6.2. Metabolismo anormal	125
IV.7. El cólico saturnino	127
IV.8. Procedimientos médicos específicos	128
IV.9. Disturbios en el metabolismo del hemo	129
IV.9.1. Inhibición del ALA-D por el Pb	131
IV.10 Tratamiento de la intoxicación por Pb	133
Referencias	135

IV. INTOXICACION POR PLOMO

IV.1. Introducción

La intoxicación crónica por Pb es la enfermedad profesional más frecuente en nuestro país por la gran utilización de este metal en la industria.

El metal no solamente constituye una amenaza para quienes tienen un contacto directo con el mismo, sino también, en forma accidental, para los usuarios y aún para los familiares de las personas expuestas.

Las formas más severas de intoxicación por Pb son relativamente menos frecuentes ahora, en comparación con lo que ocurría años atrás. Existe actualmente un mayor control y además, los médicos industriales han adquirido más experiencia en este tema.

A pesar de todo, todavía no se ha alcanzado el grado de control requerido como para evitar que la intoxicación por Pb sea aún una de las causas de inhabilitación temporaria de un gran número de trabajadores, en una amplia gama de industrias. Además, en algunos casos, las personas continúan trabajando, aunque se hayan presentado síntomas leves de intoxicación con Pb, que se aceptan como simples malestares generales.

Las causas de la gran incidencia de la intoxicación industrial por Pb son numerosas; siendo las siguientes las más importantes cuando se trata de erradicar esta enfermedad de una industria o un área industrial.

Primero en importancia entre estas causas está el desconocimiento por parte del industrial, de los médicos y técnicos, de los factores primarios que determinan la frecuencia y severidad de la intoxicación con Pb, en una dada ocupación, así como de los medios que existen actualmente para reconocer estos factores.

Una segunda causa, son los continuos cambios en la tecnología de las industrias modernas; el consecuente surgimiento de nuevos procesos y productos, crean así nuevas y a veces irreconocibles posibilidades de exposición al Pb.

Un tercer factor lo constituye el incremento en el número

ro y cantidad de materiales y artefactos hechos con Pb. Bajo estas circunstancias suelen aumentar las fallas en los equipos, debido con frecuencia a un personal mal entrenado, tanto para la manipulación y supervisión de los equipos, como para el control de la higiene personal.

Cualquiera sea la causa o combinación de causas que lleven a una contaminación con Pb, los medios de prevención pueden encontrarse haciendo un estudio cuidadoso del origen, la naturaleza y la magnitud de la exposición al Pb para poder reducirlo hasta niveles compatibles con la seguridad del personal de planta (Kehoe, 1963).

IV.2. Vías de intoxicación por Pb

Existen dos vías de entrada de los compuestos de plomo inorgánicos (los compuestos orgánicos se discutirán más adelante) en el cuerpo humano:

- a) por el tracto respiratorio, a través de la inhalación de vapor, humo, polvo o niebla;
- b) por el tracto digestivo, por ingestión de compuestos de Pb atrapado en la parte superior del tracto respiratorio o introducidos en la boca con la comida, cigarrillos, herramientas, dedos y otros objetos. Los compuestos inorgánicos de Pb, en forma sólida o en soluciones o dispersiones en diversos solventes no penetran la piel humana normal o dañada, en cantidades significativas. Ciertos compuestos pueden irritar la piel, pero aún en esas condiciones la absorción cutánea no es significativa.

La presencia de vapores, humo o polvo fino de compuestos inorgánicos de Pb en el aire respirado por los trabajadores es el factor más importante. De todas maneras, la vía oral es también una ruta importante de ingestión (Calabrese y Astolfi, 1980).

IV.3. Fuentes de intoxicación

- a) Profesional: Los oficios en los cuales el Pb es un elemento muy común son: los de la industria metalúrgica, con sus múlti

ples matices laborales: soldadores, laminadores, trafiladores, chapistas, mecánicos, peones, etc.; los trabajos con acumuladores y baterías eléctricas, pintores y obreros de fábricas de algunas pinturas, fábricas de plomo, linotipistas y obreros gráficos, herreros, obreros de fábricas de cables, de colores y tinturas, de municiones; industria del vidrio, industria automotriz, mecánicos dentales, esmaltadores, grabadores, pulidores, joyeros, mineros, fábricas de nitroglicerina, de caños, de curtido de pieles y cueros, de masillas, de productos plásticos con piroxilina, de azulejos, de papeles plateados, plomeros y albañiles, etc. Como se ve, un espectro amplísimo dentro del cual el plomo interviene de una u otra forma.

- b) Fuentes accidentales: Cenizas con sales de Pb, intoxican por vía inhalatoria y también oral, suelen ser graves por la contundencia y rapidez de la aparición de los síntomas. Ocurren en los vecindarios de fábricas que expelen tales tóxicos por sus chimeneas y plantean un problema sanitario a nivel humano, veterinario y vegetal.

Pinturas, cuando contienen plomo como base de colorantes o como antióxido (cromato de Pb; óxido de Pb o minio; hidrocromato de Pb). Considerando que las pinturas llegan a contacto con personas de toda clase social y todo medio, el número de víctimas, especialmente niños, resulta importante.

El agua solubiliza el plomo de cañerías nuevas. La ionización del metal se ve a menudo favorecida por la costumbre de emplear las cañerías, como descarga a tierra para muchos aparatos domésticos: lavarropas, heladeras, etc. (Calabrese y Astolfi, 1980).

Otras fuentes pueden ser los cabezales metálicos de sifones, en éstos, el ácido carbónico de la soda ataca al Pb, formando carbonato de Pb; o los alimentos enlatados, donde el contenido ácido (vinagre, por ejemplo) origina acetato de Pb con el metal usado en la soldadura; o las frutas tratadas con arsénito de Pb como insecticida. Los perdigones alojados en el cuerpo de una persona tras un disparo liberan muy pequeñas cantidades de Pb; su peligro puede estar cuando el número de ellos es elevado; heridas de balas (Dillman y col, 1979); afrodisíacos que contienen Pb, comunes en oriente (Brearley y Forsythe, 1978).

Los problemas relacionados con el tetraetilo de Pb y otros alquilos de Pb, difieren tanto, cuali y cuantitativamente, de aquellos relacionados con los compuestos inorgánicos, que requieren un tratamiento separado.

Deben diferenciarse las ocupaciones que implican una exposición al tetraetilo de Pb en forma concentrada, de aquellas en las cuales sólo se manipulea la nafta conteniendo tetraetilo de Pb como antidetonante. La dilución del tetraetilo de Pb con nafta en proporción de 1:1000 o más, previene la absorción de cantidades apreciables de tetraetilo de Pb a través de la piel. La vaporización del tetraetilo de Pb en esas condiciones no es significativa. Por eso, la manipulación de la nafta con tetraetilo de Pb no suele ser peligrosa. Sin embargo, aquellas personas que intervienen en la fabricación y distribución del tetraetilo de Pb, así como aquellos que deben entrar en los tanques de almacenamiento de nafta, para repararlos o limpiarlos, pueden estar expuestos a cantidades peligrosas de Pb (Kehoe, 1963).

IV.4. Criterios clínicos

Se agrupan los síntomas en cuatro grandes síndromes, de acuerdo con el tropismo del plomo:

- a) Síndrome neuropsiquiátrico: irritabilidad, vómitos de origen central, pica, convulsiones, encefalopatía hipertensiva (en pediatría), coma, parestias y parálisis, cefaleas persistentes, psicopatías diversas, impotencia sexual, frigidez, astenia, insomnio, neuritis óptica, etc.
- b) Síndrome gastrointestinal: constipación pertinaz, cólicos abdominales, dolores espasmódicos difusos, ribete gingival y manchas yugales, disgeusias, dispepsias, inapetencia, síndrome pseudoulceroso.
- c) Síndrome hematológico: anemia microcítica e hipocrómica, puntado basófilo en GR.
- d) Síndrome urinario: glucosuria, aminoaciduria (ALA, glicina), coproporfirina III.

Estos síntomas no son patognomónicos de saturnismo y pueden darse de manera permanente o esporádica. Su reconocimiento tiene el inmenso valor de despertar la sospecha de una intoxicación.

ción plúmbica, en especial cuando se asocian algunos o varios signos de los puntos a, b, c y d aleatoriamente (Calabrese y Astolfi, 1980).

IV.4.1. Síndrome neuropsiquiátrico

Los mecanismos por los cuales se presentan los síntomas en el sistema nervioso no han sido claramente dilucidados. Existen dos hipótesis diferentes. Una trata de explicar las neuropatías como una manifestación de la toxicidad de las porfirinas, del ALA, o de ambos. Otra postula que la deficiencia de hemo es la causa directa de la neuropatía (Pierach y Edwards, 1978).

La elevada cantidad de plomo circulante se asocia con hiperactividad, y con deficiencias en la función motora y en la conducta (Cory-Slechta y Thompson, 1979).

Aunque el ALA y el PBG, administrados subcutáneamente a ratas, no parecen alterar la conducta de los animales, no puede descartarse la posibilidad de que una producción incrementada de estos precursores pueda ocasionar las disfunciones del sistema nervioso, que se observan en los intoxicados con Pb. Inyectando ALA directamente en el ventrículo lateral del cerebro, para traspasar la probable barrera sangre-cerebro, se encontró que, según la dosis, se podían inducir convulsiones nerviosas (Pierach y Edwards, 1978).

Aunque estos resultados parecerían apoyar la teoría de que el ALA o el PBG podrían ser la causa de las manifestaciones nerviosas, hay dos razones que sin embargo no están de acuerdo con esta hipótesis: primero, que las dosis usadas fueron mucho mayores que las encontradas en los pacientes, aún durante una crisis, y segundo, que las convulsiones son atípicas en los ataques agudos de intoxicación por Pb.

La otra explicación posible, relativa a un bloqueo parcial de la síntesis del hemo en el sistema nervioso, no ha sido aún demostrada o refutada experimentalmente (Pierach y Edwards, 1978).

IV.4.2. Síndrome renal

Entre los órganos más afectados por el Pb están los riñones.

En adultos, el Pb puede provocar anormalidades funcionales y morfológicas en los riñones, con distintos grados de daño, particularmente en los vasos y túbulos, manifestados por oliguria, proteinuria y cilindruria (Haeger-Arönsen, 1960).

En la intoxicación aguda por Pb el cuadro está dominado por lesiones reversibles en los túbulos. En la intoxicación crónica, las lesiones vasculares son progresivas y desarrollan finalmente nefroesclerosis (Haeger-Arönsen, 1960).

Además de la proteinuria se produce glucosuria, de origen renal, como así también aminoaciduria e hiperfosfaturia. Esta combinación de síntomas localiza el ataque del Pb a los riñones en los túbulos proximales, que son los que normalmente reabsorben estas sustancias (Haeger-Arönsen, 1960).

Tanto en niños como en adultos, la hemodinamia renal y la función glomerular no se ven afectadas. La aminoaciduria, fosfaturia y glucosuria se presentan sólo ocasionalmente (Suketa y col, 1979).

La excreción urinaria de agua y sodio se eleva en ratas por la administración de Pb, mientras que la excreción urinaria de K aumenta en menor escala. Además, se observa un descenso en la concentración sérica de Na en ratas tratadas con Pb. La reabsorción del Na y K por los túbulos renales parece estar afectada por el Pb.

La actividad de la $(Na^+ y K^+)ATPasa$ renal desciende marcadamente 6 horas después de la administración del Pb y luego se recupera lentamente (Suketa y col, 1979).

IV.4.3. Intoxicación por plomo y cáncer

Se ha postulado que el Pb juega también un papel importante en la neoplasia humana, como lo demuestran estudios realizados *in vitro* con células que sufrieron transformación maligna y con ensayos de carcinogénesis en animales de experimentación.

El número elevado de muertes por cáncer en el aparato digestivo o en el aparato respiratorio, pueden llegar a ser significativas, si bien no hay datos suficientes (Kang y col, 1980).

IV.4.4. Efecto del Pb en el período fetal y en la infancia

La transferencia de Pb a través de la placenta humana y su potencial peligro para el feto ha sido reconocido desde las primeras décadas de este siglo. Los efectos del Pb dependen de la dosis. En nuestros días, las cantidades de Pb tienden a ser menores que antiguamente, los cuales estaban claramente asociados con daño fetal severo. El Pb puede transferirse desde la placenta al feto en diferentes etapas de la gestación, comenzando en las primeras 12 a 14 semanas, y se ha encontrado en el cordón umbilical de algunos recién nacidos en concentraciones que variaban de 10 a 30 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (Singh y col, 1978).

Los diagnósticos presuntivos de intoxicación fetal se hacen sobre la base de una conocida exposición de la madre al Pb.

La mayor concentración se encuentra en los huesos.

Los niños expuestos al Pb presentan dificultades en el aprendizaje del nombre de los objetos, en la memoria visual y en la conceptualización. La demora en el lenguaje, particularmente la dificultad para repetir sonidos nuevos puede deberse a la depresión de los centros cognocitivos.

Es interesante observar que ovejas expuestas prenatalmente a altos niveles de plomo en la sangre materna tienen problemas de discriminación visual hasta que alcanzan de 10 a 15 meses de edad (Singh y col, 1978).

Los animales adultos sólo necesitan mantener una concentración estacionaria de hemoglobina y citocromos para su normal funcionamiento. Pero, durante el desarrollo postnatal del cerebro, el contenido de citocromos aumenta hasta adquirir las características metabólicas del animal adulto. Este período de síntesis neta de citocromos es muy sensible a la inhibición de la síntesis del hemo (Bull y col, 1979).

En experiencias en las cuales se expusieron animales a altas concentraciones de Pb, se observó una demora en el desarrollo de la compartimentalización metabólica en el cerebro.

Consecuentemente, en animales jóvenes expuestos al Pb, el incremento normal de la concentración cerebral de citocromos puede verse afectada de dos maneras: por inhibición específica de la síntesis del hemo o afectando el desarrollo del cerebro por un proceso más general, por ejemplo, por inhibición de la síntesis proteica (Bull y col, 1979).

La intoxicación con Pb tiene un pico de incidencia en niños de 1 a 3 años de edad. La deficiencia de Fe, por otro lado, es una de las insuficiencias nutricionales más comunes entre los niños y comúnmente acompaña a la intoxicación por Pb infantil (Six y Goyer, 1972), constituyendo además un poderoso agravante.

La deficiencia de Fe aumenta la retención del Pb, tanto en tejidos blandos como en huesos, y también la absorción de otros metales, como manganeso, cobalto y Zn.

Una dieta pobre en Ca incrementa los efectos tóxicos de la misma dosis de Pb (Six y Goyer, 1972).

Se demostró que trazas de elementos como zinc y cobre son capaces de proteger a las ratas de los efectos tóxicos del Pb. Esta puede ser una de las causas por las cuales las ratas son más resistentes a la intoxicación por Pb y enfatiza la importancia de una alimentación balanceada en la prevención de la contaminación por Pb (Johnson y Kleinman, 1979).

IV.5. Criterios de laboratorio

La presunción de intoxicación plúmbica se corrobora por:

- a) ALA-Dehidrasa eritrocitaria disminuída.
- b) ALA aumentada en orina (normal hasta 2 mg en 24 horas).
- c) Coproporfirina III aumentada en orina (más de 30 μ g en 24 horas).
- d) Investigación de la plumbemia: normal hasta 40 μ g por 100 g de sangre; de 40 a 80 : presaturismo o contaminación; más de 80 μ g: saturnismo.

Estos valores no pueden emplearse en casos de exposición a tetraetilo de Pb. La absorción del tetraetilo de Pb no produce un aumento del contenido de Pb en sangre, proporcional a

la cantidad de Pb absorbido. Un análisis del metal en sangre en estas circunstancias llevaría a resultados erróneos (Kehoe, 1963).

- e) Investigación de la plumburia: más de 80 μg de plomo en 24 horas en pacientes sin tratamiento, indican saturnismo. La plumburia es más fidedigna que la plumbemia para la vigilancia del enfermo y la valoración de los resultados del tratamiento. La concentración de Pb en orina provee un criterio analítico para la estimación de la exposición y la absorción del tetraetilo de Pb (Kehoe, 1963).
- f) Glóbulos rojos con punteado basófilo, en proporción 0,1 por mil o más.
- g) Radiografías de huesos largos - en jóvenes - con incremento en la densidad de las metástasis y diáfisis (donde es más activo el depósito cálcico, reemplazado por Pb en el intoxicado).

IV.6. Metabolismo del Pb en el hombre

IV.6.1. Metabolismo normal

El Pb ingresa generalmente por vía digestiva. Sólo una pequeña porción (8 a 10%) del Pb ingerido, normalmente se absorbe en el organismo. La mayor parte atraviesa el tracto digestivo sin absorberse y aparece en las heces. La porción absorbida se distribuye principalmente en el esqueleto, donde se deposita como trifosfato plúmbico (en lugar de trifosfato cálcico), y también en otros tejidos, incluido el hígado, donde pone en juego la función antitóxica de este órgano que lo elimina parcialmente con la bilis. Cuando el aporte supera las posibilidades de excreción de la glándula hepática, pasa al torrente circulatorio, quedando todavía como vías de egreso la saliva, el sudor, la leche y principalmente la orina. La concentración del Pb en la sangre depende de dos factores: la velocidad de absorción desde los intestinos y los pulmones y la magnitud de la corriente de Pb que entra en la circulación desde los tejidos del cuerpo. Sólo se encuentran trazas de Pb en el plasma, más del 95% se encuentra en los eritrocitos.

En una persona normal, la mayor parte del Pb se encuen-

tra en el esqueleto; los huesos largos, tales como el fémur, contienen mayores cantidades que los huesos planos. Esta relación se invierte luego de un período de absorción anormal.

Las cantidades promedio de Pb presentes en el cuerpo de un adulto normal no son menores de 100 mg ni mayores del triple de ese valor, variando de acuerdo con el peso y la calidad y cantidad de comidas y bebidas consumidas. No hay acumulación lenta ni progresiva del Pb en el organismo en las condiciones descritas (Kehoe, 1963; Calabrese y Astolfi, 1980).

IV.6.2. Metabolismo anormal

Cuando aumenta la exposición de un individuo por encima de las cantidades normales, ya sea por una elevación en el contenido de Pb en su comida o bebida o en el aire que respira, pueden encontrarse rápidamente signos de este aumento, aunque haya sido de poca magnitud.

Cuando se ha ingerido una cantidad inusual de Pb por boca en una sola ocasión, aumentará el contenido de Pb en heces, de uno a tres días después (hasta que el tracto digestivo se haya evacuado totalmente). Si la ingestión de cantidades anormales se repite más veces, a intervalos, la excreción fecal de Pb aumentará en intervalos correspondientes, y si la ingestión es continua, el nivel aumentará regularmente. El contenido de Pb en heces de los trabajadores de industrias relacionadas con el Pb aumentará también si trabajan sin protección respiratoria en una atmósfera que contenga polvo de Pb, si su diámetro es mayor de 1 μm .

El Pb ubicado en la boca se combina con los sulfuros producidos por la putrefacción habitual de los alimentos, dando por resultado sulfuro de Pb que se deposita debajo del epitelio de la mucosa gingival y yugal, en forma de manchas características, próximas al cuello de los dientes. Estas manchas se intensifican cerca de las caries por la mayor presencia de sulfuros, y en ocasiones, forman una verdadera guirnalda ("ribete de Burton"). El signo no es específico del Pb; otros metales pueden producirlo, con tonalidades apenas diferentes. Este proceso explica también el gusto "raro", a veces dulce, que siente el enfermo, por efecto de la disgeusia causada por el Pb (Calabrese y Astolfi, 1980).

El metal se va depositando en órganos ricos en sistema retículoendotelial: médula ósea, bazo, hígado, en el sistema nervioso central y periférico, y sobre todo en los huesos, en forma de trifosfato plúmbico insoluble, con un mecanismo idéntico al del calcio, al que desplaza. En la médula interfiere por competencia con el metabolismo del hierro. Aparecen en sangre periférica formas jóvenes de hematíes, junto con anemia hipocrómica y microcítica pigmentaria; algunos GR, en proporción 0,1 por mil, tienen punteado basófilo en número de 8 a 15 por glóbulo, formada cada inclusión por ácido pentosanucleico que les confiere la reacción tintórea característica (Calabrese y Astolfi, 1980).

Luego de una exposición aguda, el Pb se encuentra inicialmente en los eritrocitos, hígado y riñones; la concentración en estos tejidos disminuye con el tiempo, y paralelamente el Pb se deposita en los huesos. Los efectos tóxicos del metal no están directamente relacionados con su afinidad por un tejido en particular; así, la encefalopatía en la fase final de la intoxicación con Pb está en contradicción con la baja afinidad del metal por los tejidos cerebrales (Barltrop y col, 1971).

En la rata, los tejidos blandos, tales como la sangre, corazón, pulmones, hígado, riñones, bazo y tracto gastrointestinal, formarían parte de un "pool de rápido recambio", cuando se inyecta Pb por vía intravenosa. Este pool contiene el 100% de la dosis inyectada a tiempo 0, pero su valor decrece al 7% al final de la primer semana, cuando el Pb fue excretado, o transferido a otros tejidos tales como los huesos. Se detecta Pb en este pool aún 70 días después de la administración, lo que indicaría un lento recambio de la última porción de Pb en los tejidos blandos (Barltrop y col, 1971).

Cualesquiera sean las condiciones bajo las cuales se ha absorbido una cantidad anormal de Pb, hay un rápido aumento en la velocidad de absorción de Pb, evidenciado por el aumento de la concentración del metal en orina. Esto es seguido un poco más tarde (si el aumento de absorción es suficiente) por un aumento menor en la concentración de Pb en sangre. Aumenta también la distribución de Pb en los tejidos corporales, y durante un tiempo aumenta la retención y acumulación de Pb en el cuerpo. Si el aumento en la toma y absorción se mantiene constante por meses y años, la concentración de Pb en sangre, orina y tejidos au-

menta proporcionalmente. En cambio, si la absorción elevada es intermitente, los niveles de Pb en sangre y orina alcanzan un plateau luego de algunos meses, después de lo cual permanecen esencialmente constantes. Cuando se alcanzó este plateau y, mientras se mantenga, la acumulación en los tejidos aumenta muy poco.

Cuando se interrumpe la exposición, el Pb retenido en el cuerpo mantiene la concentración de Pb en sangre, orina y tejidos por encima de lo normal por un tiempo que depende de la cantidad de Pb retenido y del tiempo durante el cual se había acumulado. Así, la concentración en sangre y orina decrece progresivamente, alcanzando valores normales en un período que varía desde pocas semanas a más de un año. El tracto digestivo, por el contrario, cuando todas las partículas de la porción nasofaríngea han sido tragadas, se vacía en pocos días.

Las concentraciones normales en los tejidos se alcanzan entre los 12 y 18 meses luego de interrumpida una exposición prolongada, siendo el esqueleto el último en volver a los valores normales (Kehoe, 1963).

IV.7. El cólico saturnino

Es un cuadro agudo en una intoxicación crónica. Se atribuye a una acción del Pb sobre el plexo solar, o bien a un exceso de Coproporfirina y ALA, o bien a la acción directa del metal sobre plexos mientéricos.

Se presenta con un dolor muy agudo en el abdomen que se calma al administrar una sal cálcica por vía intravenosa. En el sistema nervioso periférico aparece una parálisis característica de los extensores de la mano, por acción del nervio radial; se dice que el enfermo hace el "signo de los cuernos". Posteriormente, toda la mano queda péndula. El mismo síntoma se observa a nivel de los miembros inferiores, con parálisis y atrofia de los extensores del pie.

En pediatría, dada la especial idiosincracia del sistema nervioso central, en plena etapa de maduración, aparecen síntomas graves con encefalopatías hipertensivas, con un índice de mortalidad del 10-15% (Calabrese y Astolfi, 1980).

IV.8. Procedimientos médicos específicos

Ciertos procedimientos específicos merecen una discusión detallada ya que no siempre son aplicados en forma satisfactoria. Se relacionan con la detección de niveles peligrosos de absorción del Pb antes de la aparición de manifestaciones tóxicas. Las evidencias que distinguen la contaminación por Pb de la intoxicación (contaminación significa tener Pb; intoxicación o saturnismo, tener los síntomas causados por el Pb), son:

- a) Algunos cambios en la sangre, de los cuales los más importantes, aparentemente, son el resultado de cierto grado de estimulación de los tejidos hematopoyéticos, con relación al gran número de formas juveniles de eritrocitos (reticulocitos y eritrocitos con punteado basófilo).
- b) El desarrollo de depósitos de sulfuro de Pb en mucosa gingival y mucosa del colon y ano.
- c) Aumento en el contenido de Pb en sangre y orina (o tejidos) por encima del nivel normal.

Los dos primeros no son evidencias específicas de contaminación con Pb, ya que muchos estímulos afectan el tejido hematopoyético, y muchos metales dan líneas azuladas en los dientes o depósitos negros en la mucosa anal. El tercero, por el contrario, es enteramente específico y útil para indicar el grado de absorción del metal.

a) El significado del punteado basófilo de los eritrocitos: Existen normalmente en la sangre humana, en cantidades pequeñas. El número varía muy poco con pequeñas cantidades de Pb, pero a altos niveles de exposición y absorción, su número en sangre circulante presenta una tendencia irregular hacia un aumento. Se observan importantes variaciones en el grado de respuesta individual, y diaria, pero bajo condiciones severas de exposición al Pb se encuentra un aumento neto si se consideran grupos de personas y no casos individuales. Lamentablemente, este aumento no es marcado ni proporcional, de manera que buen número de resultados caen dentro del valor normal.

Ciertos factores adicionales demuestran el valor de los exámenes en sangre de este tipo, a pesar de estos inconvenientes, cuando están bien empleados e interpretados. Bajo condiciones de exposición peligrosa al Pb, se produce un aumento progre

sivo del número de eritrocitos con punteado basófilo, sugiriendo un aumento en la velocidad de absorción del metal. Este fenómeno no puede tomarse como una evidencia definitiva de una intoxicación por Pb, pero debe tenerse en cuenta en relación con la magnitud y velocidad del incremento. En cambio, la ausencia de eritrocitos con punteado basófilo, es indicativo de que no se trata de una intoxicación por Pb. Las únicas excepciones son los casos de intoxicación con tetraetilo de Pb, ya que la absorción de este compuesto no provoca anomalías hematológicas (Kehoe, 1963).

b) El significado de la "línea de Plomo": cuando el contenido de Pb es suficientemente elevado puede aparecer una línea oscura en el margen de los dientes, en la mucosa gingival inflamada por invasión bacteriana, o sea cuando se produce sulfuro de hidrógeno localmente. Pueden observarse depósitos de sulfuro de plomo en encías de personas que no presentan síntomas ni signos de intoxicación, y su acentuación advierte de un posible peligro. La línea de Pb debe diferenciarse de depósitos similares que resultan de la precipitación de otros sulfuros metálicos, especialmente bismuto.

c) El significado de los resultados del análisis del contenido de Pb, en sangre, orina y distintos tejidos (post-mortem): ya se ha hablado del contenido de Pb en sangre y orina, así como de la absorción y eliminación del Pb por diversos tejidos.

IV.9. Disturbios en el metabolismo del hemo

A nivel de metabolismo celular, el Pb actúa inhibiendo las enzimas sulfhidrúlicas o que dependen de la presencia de grupos -SH para su actividad. Y la manifestación más clara del efecto inhibitorio del Pb sobre este tipo de enzimas, es el disturbio que produce en la biosíntesis del hemo.

Aunque la mayoría de las enzimas de este camino son dependientes de la presencia de grupos -SH para su actividad y por ende, sensibles al Pb, las ~~dos~~ etapas sobre las cuales el Pb ejerce mayor acción inhibitoria son las que llevan a la formación del PBG ~~y~~, la conversión de Coproporfirinógeno III (CPG III) a Protoporfirina IX y la quelación de ésta con el Fe (Kreimer-Birnbaum y Grinstein, 1965).

Ya en 1880, Binniendijk señalaba la presencia de porfirinas en la orina de un intoxicado con Pb. Tal vez sea éste el primer antecedente clínico definido como tal del efecto tóxico del metal sobre la síntesis del hemo.

En 1895, Stokvis reproduce esta porfirinuria en forma experimental en conejos, administrándoles acetato de Pb.

En 1957, Haeger-Arönsen encontró aumento en la excreción urinaria de ALA en trabajadores que estaban en contacto con Pb. La excreción de ALA se encuentra marcadamente incrementada en individuos intoxicados con Pb y moderadamente aumentada en personas contaminadas con Pb, o con una historia de intoxicación. Esto se registró en la mayoría de los trabajadores examinados, aún cuando la excreción de coproporfirinógeno no estuviera por encima del valor normal. Estos hallazgos están indicando que la determinación de ALA en orina es un método de diagnóstico más sensible que la determinación de coproporfirina urinaria. En los individuos estudiados por Haeger-Arönsen (1957) la excreción de PBG era normal o sólo estaba ligeramente aumentada. En conejos intoxicados con Pb se observa un incremento en la excreción urinaria de PBG (Haeger-Arönsen, 1960; Sano, 1958) y URO aumentada en médula ósea (Schmid y col, 1950; Schwartz y col, 1952). También se encontró URO I en pacientes con saturnismo (Bashour, 1954).

Los niveles elevados de ALA se deben a una inhibición del ALA-D, ya que en casos de intoxicación con Pb en humanos, esta enzima se encuentra inhibida entre un 80-100% (Wada, 1976).

El Pb interfiere también en la última etapa de la biosíntesis del hemo, catalizada por la ferroquelatasa, de manera tal que interfiere con la quelación de la protoporfirina (PP) por el hierro (Barnes y Jones, 1973), y en consecuencia, tiene lugar una acumulación de PP. Los GR constituyen un elemento indicativo de esta inhibición, ya que puede demostrarse la presencia y exceso de PP por fluorescencia. Se ha establecido que en GR de individuos intoxicados con Pb la PP se encuentra quelada con Zn (Zn-PP) (Lamola y Yamane, 1974).

El mecanismo exacto por el cual el Pb interfiere en esta etapa de la biosíntesis del hemo aún no se ha dilucidado. El Pb puede actuar como un veneno mitocondrial, interfiriendo con

el transporte activo del Fe a través de la membrana mitocondrial (Bovora y col, 1973) o puede inhibir directamente a la ferroquelatasa. Teniendo en cuenta que la Zn-PP se encuentra elevada tanto en intoxicación con Pb como en la deficiencia de Fe, debe existir alguna similitud entre ambos procesos (Lamola y col, 1975).

En humanos, los niveles de PP en GR tienen una relación logarítmica con los niveles de Pb (Piomelli y col, 1973). En conejos de india o cobayos los niveles de PP no se ven afectados por la administración subcutánea de Pb. Existe una gran variación biológica entre las especies, y aún dentro de la misma especie la respuesta a la intoxicación aguda por Pb es muy variada, pero con referencia a sus efectos sobre la biosíntesis del hemo, entre los animales estudiados, ninguna ha presentado una respuesta tan sensible a la intoxicación con Pb como los humanos (Hart y col, 1980).

IV.9.1. Inhibición del ALA-D por el Pb

La correlación entre la concentración de Pb en sangre y la actividad de ALA-D se ha utilizado con mucha frecuencia y es un índice valioso de exposición al Pb, por cuanto se trata de un parámetro muy sensible de la intoxicación plúmbica, tanto aguda como crónica, a diferencia de los niveles de protoporfirina, que refleja los efectos del Pb en la médula ósea. Además, la Proto no sólo está elevada en la intoxicación por Pb, sino también en la anemia por deficiencia de Fe; en este último caso, la actividad del ALA-D no se encuentra afectada significativamente (Granick y col, 1973).

El Pb se uniría a la enzima a través de los grupos -SH proteicos. Este metal inhibe al ALA-D *in vitro* y este bloqueo puede revertirse, al menos parcialmente, protegiendo los grupos -SH mediante el agregado de tioles como el glutatión (Hapke y Pryge, 1973).

Se encontró una correlación lineal entre el contenido de Pb en sangre, el logaritmo de la actividad del ALA-D también en sangre y el contenido de ALA en orina (Wada, 1976).

Existe un valor umbral de Pb en sangre (aproximadamente 15 mg/100 ml) por debajo del cual la actividad del ALA-D no es

tá directamente relacionada con el nivel de Pb. La actividad enzimática se halla influida por factores genéticos y por lo tanto, los valores de actividad del ALA-D son útiles para evaluar el nivel de la exposición al Pb sólo cuando éste es mayor que dicho umbral (Wada, 1976).

La recuperación de la actividad del ALA-D es más rápida en aquellas personas expuestas poco tiempo al Pb y que presentan una menor concentración de Pb en sangre (Haeger-Arönsen y col, 1974).

Diferentes mecanismos de inhibición del ALA-D operan aparentemente en eritrocitos lisados de animales tratados con Pb y en hemolizados de animales no tratados, a los cuales se les ha agregado Pb, *in vitro* (Vergnano y col, 1969).

Se propuso que ambos mecanismos involucraban la interacción de los iones metálicos con grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad enzimática, sin embargo, esta hipótesis no explicaría satisfactoriamente el hecho de que metales con mayor afinidad que el Pb por estos ligandos, tales como mercurio, plata y cadmio son inhibidores menos potentes del ALA-D. En general, se ha intentado explicar el mecanismo de inhibición por Pb en base a posibles interacciones del metal con la enzima. Sin embargo, utilizando RMN-Carbono 13 del ALA, se han obtenido evidencias de que las sales de plomo divalente interactúan con el sustrato ALA para formar un complejo que puede contener un máximo de dos moléculas de ALA por átomo de Pb (Baxter y col, 1979).

Utilizando acetato de cadmio, calcio, plata, sodio o zinc, o el sólo anión acetato, no se produjeron cambios similares en el espectro RMN de carbono 13 del ALA, sugiriendo que el Pb debe tener una afinidad especial para interactuar con el ALA. De las magnitudes relativas de los efectos sobre la resonancia de distintos átomos de carbono, pudo inferirse que el principal sitio de interacción del Pb con el ALA es en el carbono α y en el carboxilo, y quizás el carbono γ sea un sitio de menor importancia.

La capacidad del Pb de interactuar con el ALA puede ser significativa en cuanto a los efectos del Pb sobre la enzima ALA-D. La inhibición del ALA-D puede, entonces, concebirse por lo menos en parte, como el resultado de la formación de un complejo Pb-ALA, dando lugar a un sustrato inutilizable, o por la

formación de un complejo ternario abortivo enzima-Pb-ALA (Baxter y col, 1979).

Dado que otros metales, conocidos como inhibidores del ALA-D, aunque en menor grado que el Pb, poseen muy poca o ninguna afinidad por el ALA, las interacciones específicas del Pb con el sustrato, justificarían la gran potencia inhibitoria de este metal. Por otro lado, la mayor afinidad de la plata y el cadmio por los sulfhidrilos (Vallee y Ullmer, 1972) asociada a un efecto inhibitorio menor en comparación con el Pb, sugeriría que el mecanismo de inhibición del ALA-D por metales pesados no involucra solamente reacciones entre este tipo de residuos proteicos y los iones metálicos. Las concentraciones de Zn requeridas para revertir la inhibición por Pb son varios órdenes de magnitud mayores que las de Pb presentes. Parece ser que el Zn sería necesario para un máximo de actividad del ALA-S *in vivo* (Finelli y col, 1975) indicando que este metal interactuaría con la enzima, más que con el sustrato. El Pb y el Zn, así como también el Ni, actúan sobre un sitio alostérico de la enzima, el cual, sólo en parte, sería compartido por el Zn y el Pb (Trevi- san y col, 1980). Este postulado estaría de acuerdo, por ejemplo, con un mecanismo que explicara la reversión de la inhibición del ALA-D por Pb, por efectos de Zn, según un desplazamiento del ALA, de su complejo con el Pb, por medio de una enzima con actividad óptima conteniendo Zn (Baxter y col, 1979).

IV.10. Tratamiento de la intoxicación por Pb

El Pb es un tóxico acumulativo. El Pb incorporado se libera muy lentamente y sólo cuando ha cesado la exposición. Por eso, los síntomas clínicos y bioquímicos disminuyen espontáneamente sólo en forma muy lenta.

El método de detoxificación más efectivo es la terapia con sustancias quelantes. Los quelantes compiten con los grupos afines al metal en el organismo; los complejos metal-quelato son solubles en agua y se excretan rápidamente por vía renal. Por el momento, sólo el $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$ y la penicilamina han probado ser efectivos (Doss, 1978; Perderson, 1978). Además del Pb, muchos otros iones metálicos pueden formar quelatos. Durante el tratamiento con quelantes se presentan una serie de efectos

colaterales, a causa de la interferencia con sustancias fisiológicas esenciales presentes en trazas en el organismo. Estos efectos laterales pueden evitarse, compensando la disminución de los biometales por administración exógena de los mismos.

La D-penicilamina también interfiere con la vitamina B₆, que debe, por lo tanto administrarse diariamente en dosis de 40 mg/día, durante el tratamiento con el antibiótico.

Se considera que el CaNa₂-EDTA es más efectivo que la D-penicilamina. Se debe administrar parenteralmente y no puede utilizarse cuando hay daño renal. De manera que antes de comenzar la terapia, debe asegurarse la ausencia de nefropatías (Calabrese y Astolfi, 1980).

Para terapias prolongadas es mejor la D-penicilamina por cuanto es efectiva en forma oral y posee baja toxicidad (Hapke y Pryge, 1973).

En niños se recomienda la administración de BAL (Dimercapto propanol) cuya estructura química tiene dos grupos sulfhidrilos que se unen al metal, previo a la administración de EDTA.

REFERENCIAS

- Barltrop, D.; Barrett, A.J. & Dingle, J.T. (1971) J. Lab. Clin. Med. 77, 705.
- Barnes, R. & Jones, O.T.G. (1973) Biochim. Biophys. Acta 304, 304.
- Bashour, F.A. (1954) J. Lab. Clin. Med. 44, 764.
- Baxter, C.S.; Wey, H.E. & Cardin, A.D. (1979) Toxicol. Appl. Pharmacol. 47, 477.
- Binniendijk, (1880) citado por Stokvis (1895).
- Bovora, J.; Porka, P. & Neuwirt, J. (1973) Biochim. Biophys. Acta 320, 143.
- Brearley, R.L. & Forsythe, A.M. (1978) Brit. Med. J., Dic.23, 1748
- Bull, R.J.; Lutkenhoff, S.D.; Mc Carthy, G.E. & Miller, R.G. (1979) Neuropharmacology 18, 83.
- Calabrese, E.J. & Astolfi, M. (1980) En "Toxicologia" p. 131-139. Ed. Kapelusz.
- Cory-Slechta, D.A. & Thompson, T. (1979) Toxicol. Appl. Pharmacol. 47, 151.
- Dillman, R.O.; Crumb, C.K. & Lidsky, M. J. (1979) Am. J. Med. 66, 509.
- Doss, M. (1978) International Symposium Clinical Biochemistry. Springer - Verlag - Berlin Heidelberg. N. York.
- Finelli, V.N.; Klauder, D.S.; Karaffa, M.A. & Petering, H.G. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 303.
- Granick, J.L.; Sassa, S.; Granick, S.; Levere, R.D.; Kappas, A. (1973) Biochem. Med. 8, 149.
- Haeger-Arönsen, B. (1957) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 9, 211.
- Haeger-Arönsen, B. (1960) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 12, 47.
- Haeger-Arönsen, B.; Abdulla, M. & Beugt, I.F. (1974) Arch. Environ. Health 29, 150.
- Hapke, H.J. & Pryge, E. (1973) Arch. Toxicol. 31, 153.
- Hart, D.; Graziano, J. & Piomelli, S. (1980) Biochem. Med. 23, 167.
- Johnson, D.R. & Kleinman, L.I. (1979) Toxicol. Appl. Pharmacol. 48, 361.

- Kang, H.K; Infante, P.F. & Carra. J.S. (1975) Science 207, 935.
- Kehoe, R.A. (1963) Industrial Lead Poisoning in "Industrial Hygiene and Toxicology" Vol II, p. 941-985. Ed. Frank A. Patty. Interscience Publishers (John Wiley y Sons, N. York - London).
- Lamola, A.A. & Yamane, T. (1974) Science 186, 936.
- Lamola, A.A.; Piomelli, S. & col. (1975) J. Clin. Invest. 56, 1528.
- Perderson, R.S. (1978) Scand. J. Urol. Nephrol. 12, 189.
- Pierach, C.A. & Edwards, P.S. (1978) Experimental Neurology, 62, 810.
- Piomelli, S.; Davidow, B. & col. (1973) Pediatrics 51, 254.
- Sano, S. (1958) Acta Haemat. Jap. 21, 337.
- Schmid, R.; Schwartz, S. & Watson, C.J. (1950) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75, 705.
- Schwartz, S.; Keprios, M. & Schmid, R. (1952) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 79, 463.
- Singh, N.; Donovan, C.M. & Hanshaw, J.B. (1978) J. Pediatrics, 93, 1019.
- Six, M.K. & Goyer, R.A. (1972) J. Lab. Clin. Med. 79, 128.
- Stokvis, B.J. (1895) Zach Klin. Med. 28, 1.
- Suketa, Y.; Hasegawa, S. & Yamamoto, T. (1979) Toxicol. Appl. Pharmacol. 47, 203.
- Trevisan, A.; Paolo Gori, G.; Zangirolami, A.; Benevento, C. & Rosa, A. (1980) Enzyme (Basel) 25, 33.
- Vallee, B.L. & Ullmer, D.D. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41, 91.
- Vergnano, C.; Castegna, C. & Ardóño, V. (1969) Med. Lab. 60, 505.
- Wada, O. (1976) Arch. Environ. Health 31, 211.

CAPITULO V

FANTASMAS DE ERITROCITOS

V.1. Generalidades	137
V.2. Propiedades	138
V.2.1. Propiedades de los eritrocitos maduros	138
V.2.2. Propiedades de la membrana eritrocitaria	139
V.2.3. Transporte en eritrocitos	141
V.3. Preparación de los fantasmas de eritrocitos	142
V.4. Incorporación de macromoléculas en fantasmas de eritrocitos	145
V.5. Metabolismo energético en eritrocitos y fantasmas de eritrocitos	147
V.6. Características de la supervivencia de los eritrocitos cargados	149
V.7. Aplicaciones de enzimas atrapadas en eritrocitos	151
V.7.1. Sustrato en la sangre	151
V.7.2. Sustrato en tejidos	152
V.7.3. Desórdenes metabólicos de los eritrocitos	153
V.8. Terapia por reemplazo enzimático	153
Referencias	157

V. FANTASMAS DE ERITROCITOS

V.1. Generalidades

En los últimos años, ha despertado gran interés la aplicación de la terapia por reemplazo enzimático en varias enfermedades metabólicas caracterizadas por una deficiencia o bloqueo enzimático específico y primario. Para la administración exógena de la enzima o modificación de su actividad se han ensayado distintos procedimientos entre los cuales se incluyen: inyección directa de la enzima; modificación de la enzima por drogas, para aumentar o alterar su actividad catalítica, enzimas inmovilizadas sobre matrices insolubles o geles, y enzimas encapsuladas en algún tipo de transportador semipermeable.

Entre los posibles transportadores enzimáticos están los de naturaleza celular o vesicular. Estos están constituidos por una membrana que encierra un espacio capaz de contener la sustancia que se desea transportar y que limita, en mayor o menor grado, los movimientos de los iones y moléculas a través de la pared. En esta categoría se incluyen microcápsulas, cuya membrana está compuesta por sustancias no lipídicas, tal como el nylon (Chang, 1972); liposomas, que tienen una membrana sintética similar a las naturales (Gregoriadis, 1976), vesículas formadas por membranas naturales (Steck, 1974) y verdaderas células, tales como los eritrocitos (Ihler y col, 1973).

El interés en este tipo de transportadores se debe, en parte a la necesidad de proteger a la enzima de una degradación o inactivación prematura y al huésped de los conocidos efectos inmunológicos o farmacológicos indeseados, tales como reacciones de hipersensibilidad o producción de anticuerpos, y además al hecho de que es posible desarrollar transportadores tales que nos permitan dirigir la enzima, específicamente, a su sitio de acción.

Los eritrocitos poseen muchas de las características de un transportador ideal, ya que se pueden usar células provenientes del mismo paciente o animal, eliminando así el peligro de producir los efectos adversos causados por proteínas extrañas. Además, el eritrocito no sólo es biodegradable, sino que su degradación se realiza por las mismas células y de la misma manera que los eritrocitos normales.

Otra ventaja importante acerca del uso de eritrocitos, es el amplio conocimiento científico y médico que de ellos se tiene. Los hematólogos han acumulado una notable experiencia práctica acerca de estas células en áreas tales como estacionamiento prolongado, transfusiones, hemostasis. En consecuencia se conocen mejor los problemas potenciales del uso de eritrocitos cargados en humanos, que aquellos relacionados, por ejemplo, con otros transportadores como los liposomas.

V.2. Propiedades

V.2.1. Propiedades de los eritrocitos maduros

Los eritrocitos maduros son células altamente especializadas cuya función es servir como transportadores del oxígeno unido a hemoglobina. El contenido de hemoglobina es de cerca de 29 pg por eritrocito o 335 g/l de eritrocitos. Cuantitativamente, casi toda la proteína del eritrocito es hemoglobina, aunque también hay numerosas enzimas y otras proteínas estructurales.

Los eritrocitos carecen de núcleo y ribosomas, por lo tanto han perdido la capacidad de sintetizar nuevas proteínas. Tampoco pueden sintetizar lípidos "de novo" y por eso deben renovar y modificar los constituyentes de sus membranas por intercambio con el plasma. No contienen mitocondrias, por lo tanto la producción de energía proviene de la vía de la glicólisis, y no de la fosforilación oxidativa.

La vida media de los eritrocitos es de 120 días. La destrucción de las células no ocurre al azar sino como resultado de un proceso de envejecimiento poco conocido. Dado que estas células carecen de capacidad biosintética, lo sorprendente, no es que envejeczan, sino que sobrevivan tanto tiempo.

La forma normal de los eritrocitos es un disco bicóncavo, que es elipsoide con depresiones centrales en ambos lados. Toda vía no existe una buena explicación para justificar la forma de disco bicóncavo, pero se cree que debajo de la membrana del eritrocito hay una capa de proteínas responsables del mantenimiento de la forma celular. El diámetro promedio de los eritrocitos es de 8,6 μm . Tienen un espesor de 1,9 μm , un volumen medio de 86 μm^3 y una superficie de 145 μm^2 .

Existen numerosas formas anormales de eritrocitos. La más simple es el esferocito, en la cual han desaparecido las depresiones, por lo cual la célula toma forma esférica. El equinocito es una esfera con numerosas proyecciones o espinas; esta forma es potencialmente reversible. Los estomatocitos tienen forma de copa, son cóncavos de un solo lado; estas células pueden degenerar en esferocitos. Se conocen muchas otras formas de eritrocitos, asociadas con enfermedades o producidas en el laboratorio por diversos agentes (Bessis, 1973).

El volumen sanguíneo de una persona adulta normal es aproximadamente el 7% del peso corporal para el hombre y el 6,5% para la mujer. De manera que puede considerarse que el volumen sanguíneo de un hombre de 70 kg es de 5 litros. En humanos los eritrocitos ocupan el 40-50% de este volumen y hay cerca de 5×10^9 eritrocitos por litro de sangre.

V.2.2.. Propiedades de la membrana eritrocitaria

La membrana eritrocitaria contiene un peso aproximadamente igual de proteínas y lípidos. En su composición entran además ciertos carbohidratos que son los responsables de algunas de las propiedades antigénicas de la superficie, incluyendo el grupo ABO y el MN.

La superficie externa de la membrana tiene una carga neta negativa (el potencial zeta) debida principalmente a los grupos carboxilo del ácido siálico. El punto isoeléctrico está en el orden del pH 2 y aumenta hasta pH 4-5 luego de la eliminación cuantitativa del ácido siálico con neuraminidasa.

La carga negativa superficial impide que los eritrocitos entren en contacto directo y mantiene una distancia tal entre los mismos que impide su aglutinación con Inmunoglobulina IgG. En consecuencia, se pueden tratar a los eritrocitos con IgG para activarlos y ser tomados por las células fagocíticas, sin aglutinación. Por el contrario, los anticuerpos IgM pueden acortar la distancia entre eritrocitos.

El contenido de fosfoglicéridos de la membrana es del 50% del contenido total lipídico e incluye fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina como especies predominantes. Otros constituyentes lipídicos importantes de la mem

brana son la esfingomielina y el colesterol. Los glicolípidos son constituyentes minoritarios, entre ellos, el principal es el globósido (GL-4).

Los eritrocitos no tienen capacidad de sintetizar lípidos "de novo", pero pueden reemplazarlos utilizando los lípidos plasmáticos; de manera que tiene lugar un intercambio del colesterol y otros lípidos eritrocitarios con sus análogos en plasma. El colesterol eritrocitario está en equilibrio con el colesterol plasmático (Murphy, 1965). La lecitina-colesterol acil transferasa (LCAT) es importante en este aspecto porque es uno de los factores que determina el nivel de colesterol plasmático libre. También parte de la fosfatidilcolina de la membrana y otros lípidos y ácidos grasos están en equilibrio con los del plasma, aunque el intercambio no es tan rápido como el observado para el colesterol.

Las lisofosfatidilcolinas de membrana y plasmática están en equilibrio y pueden ser aciladas en la membrana con ácidos grasos libres para formar fosfatidilcolina. Las fosfolipasas y la acil transferasa pueden alterar la composición celular cuando la célula envejece o también con relación a la dieta.

La estructura lipídica de la membrana, está constituida por una doble capa, en la cual el extremo polar se enfrenta, ~~o bien~~ hacia el fluido extracelular (capa externa) ~~y o bien~~ hacia el interior de la célula (capa interna). La fracción de carbohidratos es adyacente a la lipídica y está ubicada en el medio de las dos capas. Existen evidencias que sugieren que los lípidos se distribuyen asimétricamente entre las dos capas, los amino fosfátidos principalmente en la membrana interna y los colina fosfátidos en la membrana externa (Bretscher, 1973). El colesterol se ubicaría en ambas capas, aunque en mayor proporción en la exterior (Fisher, 1976).

La membrana eritrocitaria contiene proteínas intrínsecas que han sido aisladas y estudiadas extensamente. Entre ellas se encuentran las proteínas responsables del transporte activo o pasivo dentro del eritrocito.

V.2.3. Transporte en eritrocitos

Los eritrocitos humanos contienen una concentración interna de potasio alta y una concentración de sodio baja, inversamente a lo que ocurre en el plasma. Esta simetría se mantiene, paralelamente a una difusión pasiva de estos iones, en base a la existencia de un transporte activo de sodio hacia afuera de la célula acoplado al transporte de potasio hacia adentro de la misma. El transporte no es igual para ambos iones, ya que se transfieren 3 iones sodio por cada 2 de potasio. De esta manera, tiene lugar un movimiento activo de soluto y agua a través de la membrana para equilibrar la difusión pasiva. La bomba de iones es importante para controlar el volumen celular; de manera que si el bombeo se interrumpe, el eritrocito comienza a hincharse. Este transporte es ATP-dependiente y utiliza cerca del 15% del ATP generado en la glicólisis del eritrocito (Whittam y Ayer, 1965).

El calcio y el magnesio también se transportan en forma activa. Prácticamente, todo el calcio está asociado a la membrana. Los principales sitios de unión son los residuos de ácido siálico. La entrada de Ca^{2+} en los eritrocitos está vinculada con la rigidez de la membrana (Bodemann y Passow, 1972).

Los principales aniones eritrocitarios son cloruro y bicarbonato, y aparentemente su transporte es pasivo. La membrana del eritrocito es muy permeable a estos iones comparados con el sodio o el potasio. La permeabilidad al cloruro y bicarbonato son aspectos importantes de la función eritrocitaria. El CO_2 producido metabólicamente pasa a través de la membrana y se convierte en ácido carbónico por la enzima carbónico anhidrasa eritrocitaria. Luego de la disociación en HCO_3^- y H^+ , el H^+ se combina con la hemoglobina y el bicarbonato difunde hacia afuera de la célula para ser reemplazado por iones cloruro.

Entre los aniones a los cuales la membrana es permeable se incluyen: fosfato, sulfato y algunos orgánicos tales como el piruvato (Rice y Steck, 1976). La permeabilidad a los aniones está mediada por una proteína de membrana de PM 95.000 daltons.

El transporte pasivo de agua en los eritrocitos es muy rápido. La velocidad de ingreso de la glucosa es mucho mayor que la de su metabolismo, al punto que su entrada no limita la velo

cidad de glucólisis. Otros azúcares transportados son manosa, galactosa, xilosa, arabinosa, sorbosa y fructosa. Los aminoácidos entran a velocidades variables, los más rápidos son: leucina, fenilalanina, valina, metionina y triptofano (Winter y Christiansen, 1964).

Las purinas pueden ser transportadas dentro de los eritrocitos como bases libres o como nucleósidos. El sistema de transporte para bases libres permite la entrada de ácido úrico, hipoxantina, guanina, adenina, xantina, 6-mercaptapurina y otros derivados de la purina (Lassen, 1967). Existe un sistema de transporte de nucleósidos de amplia especificidad.

Para aquellas sustancias que no son fácilmente transportadas en los eritrocitos, se encuentran sistemas de enzimas acopladas que proceden a su degradación (Pace y col., 1974).

V.3. Preparación de los fantasmas de eritrocitos

Cuando los eritrocitos suspendidos en plasma o NaCl 0,9% se diluyen en un medio hipotónico, se hemolizan, liberando hemoglobina al medio. La hemólisis comienza, para las células más sensibles, en NaCl 0,5% y se completa para las más resistentes en NaCl 0,35%. Este comportamiento diferencial se debe en parte a la heterogeneidad en la edad de los eritrocitos, ya que los jóvenes son más resistentes que los viejos.

El agua entra en la célula más rápidamente de lo que los iones dejan la misma, en consecuencia su forma cambia de un disco bicóncavo a un esferocito. Este cambio en la forma permite que el volumen que puede acomodarse bajo la superficie sea máximo. Este volumen alcanza rápidamente un valor crítico, la presión interna aumenta, la membrana se rompe y aparecen agujeros en la misma. Si el aumento en la presión es rápido, como ocurre cuando los eritrocitos se diluyen en medio hipotónico, la membrana tiende a abrirse en un solo punto para permitir la descarga de hemoglobina y material celular (Baker y Gillis, 1969; Danon, 1961; Heedman, 1958). Si el cambio en la presión osmótica es gradual, como ocurre cuando los eritrocitos se dializan contra medio hipotónico, la hemoglobina se libera uniformemente alrededor de toda la membrana, aparentemente a través de un gran número de poros (Danon, 1961).

Luego de la liberación de hemoglobina, la solución se hace más transparente, ya que el índice de refracción de las células es el del fluido circundante. Las células deben centrifugarse a velocidades mayores. Si se examina el sistema al microscopio electrónico, pueden verse en la membrana agujeros de aproximadamente 200-500 Å de diámetro. Estos agujeros son suficientemente grandes para permitir la salida de macromoléculas como la hemoglobina (Baker, 1967).

Si se añade sal hasta restaurar la isotonicidad, la solución se pone turbia, indicando que los agujeros de la membrana se cerraron. En estas condiciones ya no es más posible la entrada o salida de macromoléculas, pero los fantasmas no son necesariamente impermeables al pasaje de pequeñas moléculas o iones (Dale y col., 1977).

La hemólisis producida por agentes lipolíticos tales como saponina conduce a una ruptura permanente de las membranas eritrocitarias. En contraste, la hemólisis hipotónica es reversible. A pesar de la ruptura del góbulro rojo (GR) y la liberación de macromoléculas, metabolitos e iones solubles, las membranas pueden recuperar su impermeabilidad original a estas moléculas.

Bodemann y Passow (1972) han establecido que se pueden obtener tres tipos de células reselladas o fantasmas. El Tipo I resulta del resellado espontáneo bajo condiciones hipotónicas. Si la hemólisis se lleva a cabo a 0 °C, la formación de este tipo de fantasmas es mínima. El Tipo III se resella luego de la adición de sal, permaneciendo permeable a los iones, pero no a las macromoléculas. El Tipo II es un fantasma totalmente resellado; probablemente derivado del Tipo III. El Tipo III puede convertirse eficientemente en Tipo II por incubación a 37 °C durante una hora. Además de la temperatura, el pH, los cationes divalentes y agentes complejantes afectan el resellado de manera compleja. Los tres tipos de células se pueden separar por centrifugación en un gradiente de sacarosa. Una población de fantasmas resellados es heterogénea con respecto a la permeabilidad a los iones y probablemente también lo sea con respecto a otros parámetros.

Algunos fantasmas recuperan la misma permeabilidad a los cationes que los eritrocitos de los cuales provenían, otros no. La reconstitución de la membrana luego de la hemólisis parece ser predominantemente del tipo "todo o nada", aunque sólo pocos

fantasmas dejan de clasificarse como "reconstituídos" o "permeables". La relación entre los fantasmas reconstituídos y permeables depende de las condiciones de hemólisis y del tratamiento posterior de la membrana. El efecto del pH durante la hemólisis es importante. Existe un máximo a pH 6 y un hombro ancho en el rango de 7 a 9. Estos datos sugieren que durante la hemólisis se exponen al medio grupos ionizables escondidos. La capacidad de estos grupos de retornar a sus sitios originales dentro del interior hidrofóbico de la membrana, parece depender de la carga que toman durante su exposición al entorno acuoso. De todas maneras, caben también explicaciones alternativas (Lepke y Passow, 1972).

Para algunos propósitos es deseable preparar fantasmas que estén tan libres de hemoglobina y otras sustancias citoplasmáticas como sea posible. Esto se consigue diluyendo y lavando las células en grandes volúmenes de medio hipotónico o agua destilada. Estos fantasmas, que pueden estar libres de hemoglobina hasta un 99,95%, aún contienen la cantidad original de colesterol y fosfolípidos de membrana, poseen también actividad de ATPasa y son bicóncavos (Weed y col, 1963). La mayoría de las enzimas glicolíticas están reducidas a niveles muy bajos, como puede esperarse para enzimas citoplasmáticas, pero retienen parcialmente alguna actividad enzimática, indicando cierta interacción con la membrana (Schrier, 1963).

Para otros propósitos, por ejemplo para maximizar la supervivencia celular, es deseable preparar células cargadas que sean lo más similares posible a las células normales. Para esto deben usarse preparaciones de eritrocitos diluidas al mínimo (Ihler y col, 1975). Se ha desarrollado entonces un procedimiento en el cual los eritrocitos, concentrados hasta un hematocrito del 80% o mayor, se dializan contra medio hipotónico. Aunque las moléculas pequeñas se pierden, la concentración de macromoléculas no se altera.

Con algunas modificaciones, es posible reconstituir la composición de los iones y moléculas pequeñas de la célula. Los eritrocitos se sonicán y dializan. Las sustancias de bajo peso molecular que pasan a través de la membrana de diálisis se recuperan eliminando el agua con un evaporador rotatorio. Si se agrega agua destilada hasta obtener las concentraciones intracelulares originales, la solución resultante es osmóticamente e-

equivalente a NaCl 0,9% y puede usarse para resellar la membrana a una concentración tal que la concentración final sea equivalente a NaCl 0,9%.

V.4. Incorporación de macromoléculas en fantasmas de eritrocitos

Cuando se desea incorporar macromoléculas en fantasmas de eritrocitos, se pueden utilizar tres procedimientos generales, que se identifican como procesos de: i) prehinchado, ii) estallido y iii) diálisis. Aparentemente el grado de hemólisis final es el mismo en estos tres métodos, pero difieren con respecto al volumen de solución hipotónica usada y a la velocidad de lisis.

- i) En el proceso de prehinchado, los GR se suspenden en solución fisiológica diluída con 0,7-0,9 volúmenes de agua; en estas condiciones se hinchan pero no se lisan. Los GR hinchados se centrifugan y se elimina el sobrenadante. La macromolécula a ser incorporada se agrega en un volumen de buffer diluído igual al volumen de GR hinchados. Dos minutos después de mezclar con vortex, la hemólisis se revierte por adición de una solución diez veces más concentrada de la misma sal. Los GR resellados se incuban a 37 °C por 60 minutos antes de lavarse con solución salina para estabilizar las células cargadas.
- ii) En el proceso de estallido, los GR se diluyen en un gran volumen de solución hipotónica conteniendo las moléculas que se desean incorporar. La hemólisis, que es evidente en los primeros segundos, puede revertirse, por adición de solución salina concentrada, algunos minutos después.
- iii) Finalmente, el proceso de diálisis consiste en colocar los GR y las macromoléculas en un tubo de diálisis. La mezcla se dializa contra solución salina diluída y la hemólisis se revierte como siempre, por adición de solución salina concentrada.

En todos los procedimientos es conveniente incubar los GR resellados a 37 °C por 30-60 minutos, ya que se ha observado que cuando este paso se omite, luego ocurre lisis. Hoffman y col (1960) observaron que durante esta incubación las células

reselladas recuperan la impermeabilidad a los iones, lo cual probablemente es importante para la estabilidad del fantasma cargado.

Luego de la incubación a 37 °C, los GR cargados se lavan varias veces con solución fisiológica para eliminar la hemoglobina liberada, las macromoléculas no incorporadas, etc. El exámen al microscopio de los GR cargados muestra que son de color gris oscuro, en contraste con la apariencia refráctil de los GR normales y la virtual transparencia de los fantasmas vaciados. Los fantasmas cargados presentan una variedad de formas que incluyen esferas, óvalos, copas y los discos bicóncavos propios de los GR normales. Cuando existe máxima incorporación de macromoléculas parecen predominar las esferas (Rechsteiner, 1978).

Durante el proceso de carga, se produce una partición de macromoléculas entre el interior del GR y la solución externa. Existen las siguientes evidencias de que la mayoría de las macromoléculas están dentro del eritrocito y no adsorbidas a las membranas: 1) la lisis de los GR resellados por distintos procedimientos produce la liberación de las macromoléculas a la solución; 2) la partición se aproxima a la esperada; 3) por microscopía electrónica de secciones de GR cargados con ferritina se observan moléculas de ferritina en el interior de la células. Las evidencias indican entonces que las macromoléculas penetran en el interior del fantasma durante el encapsulamiento (Rechsteiner, 1978).

Dentro de los eritrocitos pueden atraparse proteínas, enzimas, hemoglobina, ferritina, oro coloidal, dextrano, etc. (Dale y col, 1977).

Gárdos (1954) fue el primero en usar la hemólisis hipotónica específicamente para atrapar moléculas (ATP) dentro de GR resellados. Hoffman en 1958 demostró que la (⁵⁹Fe)hemoglobina y la (¹³¹I) albúmina también podían entrar en los eritrocitos durante la hemólisis. Casi 10 años después, Seeman (1967) observó que los fantasmas de GR eran capaces de atrapar ferritina y oro coloidal durante la hemólisis hipotónica. Más recientemente, Ihler (1973) probó que los GR humanos podían incorporar β-galactosidasa de *E. coli* durante el proceso de hemólisis.

El tamaño de las macromoléculas a incorporar es, obviamenen

te, de gran interés. Ihler y col (1973) prepararon fantasmas cargados en presencia de un extracto de (^{35}S)proteínas de *E. coli* y mediante la cromatografía por columna de geles, compararon la distribución por tamaños, de las proteínas que entraban en los GR con la distribución en el extracto crudo. Encontraron que se incorporaban preferencialmente las proteínas de menores pesos moleculares con un máximo para aquellas cuyo tamaño estaba en la zona de los 90.000 daltons.

Algunas proteínas básicas, como las histonas presentan el problema adicional de su carga. Los GR poseen carga negativa en su superficie y se aglutinan en presencia de altas concentraciones de proteínas básicas. Aún a bajas concentraciones de histona, es necesario tripsinar las células para eliminar la histona adsorbida (Rechsteiner, 1978).

Suele haber dificultades con las proteínas básicas que además tienen coeficientes de difusión bajos, pues pueden unirse a las membranas, al difundir lentamente, y tienen muchas menores posibilidades de entrar por los poros transitorios de las membranas. Las proteínas muy sensibles a la oxidación pueden desnaturalizarse debido a la alta concentración de O_2 en estas células, y también es inconveniente usar proteínas que se desnaturalizan ante bajas fuerzas iónicas (Rechsteiner, 1978).

Finalmente, las proteínas neutras o ácidas, de diámetro menor de 100 \AA , se incorporan en general con buena eficiencia, por lo cual constituyen los mejores candidatos para este tipo de ensayos.

V.5. Metabolismo energético en eritrocitos y fantasmas de eritrocitos

La entrada de glucosa en el eritrocito es pasiva. La concentración intracelular de glucosa es igual que la del plasma: 5 mM. A esta concentración, la hexoquinasa, primer enzima del camino glicolítico, está saturada con respecto a glucosa ya que su K_m es 0,05 mM (Jacobasch y col, 1974).

La concentración de glucosa-6-fosfato, el primer intermediario, es de 40 μM y como ésta, también disminuye la concentración de todos los otros intermediarios, indicando que la fosfo-

rilación de la glucosa por ATP, catalizada por la hexoquinasa, es el paso limitante de la glicólisis.

La velocidad de fosforilación de glucosa es muy sensible a la concentración de ATP, de manera que si ésta disminuye, lo mismo sucede con la velocidad total de glicólisis. Por esta razón, es importante restaurar los niveles de ATP con adenina, adenosina o inosina, para asegurar la viabilidad de las células almacenadas o los fantasmas cargados.

Las actividades de las otras enzimas del camino glicolítico son mucho mayores que la de hexoquinasa. De manera que aún cuando ocurra una considerable pérdida de actividad enzimática durante la hemólisis hipotónica, la reserva eritrocitaria en estas enzimas, sería suficiente como para compensarla. La única que podría ser necesaria reponer sería entonces la hexoquinasa.

Ihler y col (1975) examinaron la capacidad de los fantasmas de producir lactato y encontraron que usando glucosa como sustrato, los fantasmas sintetizaban sólo el 42% de lo que producían las células normales. Esta deficiencia no parecía deberse a una falta de enzima, por cuanto no se incrementaba por agregado de hexoquinasa; sin embargo se podía estimular hasta un 70% del nivel observado en células normales por adición de adenina.

Cuando se usaba inosina en lugar de glucosa, las células hemolizadas producían tanto lactato como las células normales. Esto estaría indicando que podría haber una deficiencia a nivel del pool de adenin nucleótidos.

Puede usarse adenosina en lugar de inosina ya que los eritrocitos tienen una gran actividad de adenosina deaminasa (Conway y Cooke, 1939).

La inosina monofosfato es el precursor directo del AMP en el camino biosintético y puede convertirse en AMP (y GMP) en eritrocitos de conejo (Hershko y col, 1967). Los eritrocitos humanos no pueden convertir IMP en AMP porque no tienen adenilo succinato sintetasa (Lowy y Dorfman, 1970). Sólo la adenina o adenosina pueden servir como precursores del ATP.

Lionetti y Fortier (1963) han estudiado el metabolismo de inosina en fantasmas de eritrocitos. Estos fantasmas retenían sólo el 13% del nivel normal de proteínas intracelulares y bajos niveles de intermediarios glicolíticos, de manera que como la

interconversión de metabolitos era lenta se podía investigar con bastante comodidad.

Nakao y col (1960 a) demostraron que para el almacenamiento de eritrocitos normales la combinación de adenina e inosina era la más efectiva para regenerar los niveles normales de ATP. Otros nucleósidos como guanosina, adenosina y deoxiadenina, eran tan efectivos como la inosina en combinación con adenina.

Los fantasmas de eritrocitos transportan sodio y potasio por medio de un sistema de transporte sensible a ~~ouab~~ouabaina, que requiere ATP, usando inosina para la glicólisis y regeneración del ATP (Hoffman, 1962). Con el objeto de establecer si los fantasmas podían generar ATP a partir de glucosa para el transporte de iones, se comparó la habilidad de la glucosa y de la inosina para transportar ^{22}Na introducido externamente en la célula durante la hemólisis. Se observó que en ausencia de glucosa o inosina no había transporte, en tanto que éste se estimulaba en su presencia. En consecuencia, la producción de ATP en fantasmas, usando glucosa como fuente de energía, es suficiente para mantener el transporte de iones (Ihler y col, 1975).

Otro camino metabólico de cierta importancia en los eritrocitos es el de las pentosas, por el cual normalmente se metaboliza cerca del 10% de la glucosa (Murphy, 1960). Este camino da lactato como producto final y genera ATP, pero su función principal es la generación de fosforribosilpirofosfato (PRPP) y NADPH.

V. Características de la supervivencia de los eritrocitos cargados

Los eritrocitos pueden destruirse de varias maneras. Los eritrocitos envejecidos normalmente se degradan por fagocitosis en la médula ósea o el bazo. El mecanismo para la destrucción selectiva en el bazo se puede relacionar con su capacidad para atrapar eritrocitos durante períodos prolongados a pH y concentración de glucosa bajos. Estas condiciones descubren las limitadas reservas metabólicas de los eritrocitos envejecidos que conducen a su daño con la consiguiente captura por los macrófagos.

Si los eritrocitos están sólo ligeramente alterados, por modificaciones suaves, son tomados principalmente por el bazo, ya que este órgano detecta en particular los eritrocitos dañados o que funcionan mal. Si, en cambio, los eritrocitos están seriamente alterados, los captura el sistema reticuloendotelial. Cuantitativamente, el hígado elimina la mayor parte de los glóbulos rojos dañados, por cuanto el flujo sanguíneo a través suyo, es muy grande y las células hepáticas de Küpffer son muy activas (Wagner y col, 1962).

También pueden sufrir hemólisis intravascular y quizás la destrucción de algunos eritrocitos normales ocurre con liberación de hemoglobina (Ganzoni y col, 1971). Esto puede suceder por una desintegración causada por fuerzas físicas sobre los eritrocitos mientras circulan, por debilidad de la membrana o por incapacidad de bombear los iones efectivamente. La hemólisis intravascular es nociva, pues la hemoglobina es tóxica para el riñón. Si los niveles de hemoglobina son bajos puede unirse a la haptoglobina, que por tener un peso molecular alto se excluye de la filtración. Cuando la haptoglobina se satura por concentraciones mayores de 100-400 mg de hemoglobina por 100 ml de plasma, la hemoglobina libre pasa al riñón donde puede reabsorberse o excretarse por orina. El complejo hemoglobina-haptoglobina se elimina por el sistema reticuloendotelial.

Se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar las condiciones de estacionamiento que conduzcan a una buena supervivencia luego de la transfusión. Cuando los eritrocitos se ven privados de ATP, como ocurre luego de la adición de fluoruro o arsenito de sodio, o luego de un almacenamiento prolongado, pierden su forma bicóncava y se hacen esféricos (Nakao y col, 1960 a y b, 1961). Como consecuencia, las células se hacen rígidas y no pueden deformarse fácilmente (Weed y col, 1969). Estas células son eliminadas de la circulación por el bazo. La viabilidad post-transfusional está estrechamente relacionada con el contenido de ATP. La adición de adenina al medio de estacionamiento así como de glucosa, aumentan la viabilidad (Akerblom y col, 1967). Esto sugiere que la supervivencia de los eritrocitos cargados dependerá, en parte, de su capacidad residual para generar ATP.

Existen referencias a favor y en contra acerca de la supervivencia de los eritrocitos cargados en la circulación, se

gún distintas variables. Se encontró que las células lisadas hipotónicamente y las normales tienen cinéticas de supervivencia similares en mamíferos (De Loach y col, 1977) o en aves, que poseen eritrocitos nucleados (Ang y col, 1977). Si los eritrocitos son tratados con glutaraldehído, se eliminan eficientemente de la circulación en pocos minutos o en horas. A bajas dosis de glutaraldehído (0,05%), más del 95% de los eritrocitos se destruyen en el bazo. A dosis mayores (0,5%), cerca del 75% se destruye en el hígado. Porcentajes pequeños, pero significativos se encuentran en otros órganos como hígado y pulmón. Aún usando un agente no específico como el glutaraldehído puede obtenerse un alto grado de selectividad por el órgano.

Thorpe y col (1975) encontraron que la mitad de eritrocitos cargados con β -glucuronidasa se eliminaban de la sangre en 10 minutos y la enzima atrapada desaparecía totalmente en dos horas. Cerca del 75% de la actividad se encontraba en el hígado. Esto ocurría aunque no se hubiera intentado dañar de alguna forma los eritrocitos. Por otro lado, la asparaginasa atrapada en eritrocitos de mono continuaba circulando por lo menos por 20 días y la enzima atrapada tenía la misma vida media que en los eritrocitos control. Beutler y col (1977) trabajando con eritrocitos humanos encontraron una vida media de cinco a diez días para los fantasmas. Cuando se recubría a los eritrocitos con anticuerpos anti-Rh, las células se eliminaban con una vida media de 22 minutos.

V.7. Aplicaciones de enzimas atrapadas en eritrocitos

V.7.1. Sustrato en la sangre

Se conocen muchas enfermedades causadas por o asociadas con elevados niveles en plasma, de una molécula pequeña o sustrato. Potencialmente, los eritrocitos cargados con enzima serían capaces de diluir los niveles plasmáticos de dicha molécula, convirtiéndola en otra menos tóxica o más fácilmente degradable.

La concentración de enzima que puede atraparse en un fantasma de eritrocito está limitada esencialmente por la solubilidad de la enzima. Si se consigue atrapar cantidades altas de en

zima, de manera que la misma esté en exceso, la concentración intracelular de sustrato será esencialmente cero y la velocidad máxima de reacción estará determinada por la velocidad de entrada del sustrato.

En cambio, a concentraciones de enzima muy bajas, la concentración de sustrato dentro del eritrocito será casi la misma que la extracelular. En estas condiciones, la velocidad de reacción será esencialmente la misma para la enzima libre en solución o encapsulada en el eritrocito. Ihher y col (1975) demostraron que a bajas concentraciones de enzimas, se observan cinéticas similares para eritrocitos cargados y para eritrocitos cargados sonicados. Sin embargo, la hipoxantina inhibía la reacción en eritrocitos intactos y no la inhibía en los sonicados, indicando que, en el primer caso, la reacción tenía lugar realmente dentro del eritrocito. Cuando la concentración intracelular de enzima es alta, la velocidad máxima es igual a la velocidad de transporte del sustrato y es mucho menor que la velocidad observada con células cargadas sonicadas (o sea, enzima libre).

Estas consideraciones demuestran claramente la importancia de las cinéticas de la velocidad de entrada de sustancias en el eritrocito. Si la velocidad de entrada es baja, será imposible degradar altas concentraciones de sustrato aunque haya una gran cantidad de enzima encapsulada. En estos casos, la alternativa es aumentar el número de eritrocitos.

V.7.2. Sustrato en tejidos

Existen varios desórdenes lisosomales hereditarios caracterizados por la ausencia de alguna enzima lisosomal y la consiguiente incapacidad de degradar su sustrato.

La mucopolisacaridosis es una anomalía caracterizada por la incapacidad de hidrolizar dermatan sulfato o heparan sulfato. Empleando fibroblastos, se observó que ciertos factores correctivos eran capaces de restaurar la habilidad de degradar ese sustrato. Esos factores resultaron ser la enzima deficiente, que era utilizada por las células del medio (Neufeldt y col, 1975). Estos hallazgos han demostrado que, al menos a nivel celular, el reemplazo enzimático puede ser efectivo para reparar

caminos degradativos lisosomales.

Las esfingolipidosis se caracterizan por la incapacidad de degradar ciertos lípidos, que en consecuencia se acumulan. Muchas de estas enfermedades implican un daño en el sistema nervioso central, que probablemente podría revertirse por medio de la terapia enzimática. Dos de estas esfingolipidosis, la enfermedad de Gaucher y la enfermedad de Fabry, serían plausibles de la aplicación de este tratamiento, usando eritrocitos cargados con las enzimas defectuosas.

V.7.3. Desórdenes metabólicos de los eritrocitos

Existen defectos intrínsecos del metabolismo de los eritrocitos. En principio estos defectos pueden tratarse cargando eritrocitos del mismo paciente con la enzima deficiente. De todas maneras, es obvio que una transfusión de sangre compatible llevaría a los mismos resultados y de una manera mucho más simple. El uso de eritrocitos cargados con enzima tiene sentido cuando el paciente ha sido transfundido tantas veces que tiene problemas antigénicos con antígenos eritrocitarios menores o está desarrollando hemocromatosis, o para evitar que se produzcan estos inconvenientes.

V.8. Terapia por reemplazo enzimático

El primer estudio acerca de la utilización de enzimas inmovilizadas, en el campo de la terapia por reemplazo enzimático, en el caso de deficiencias enzimáticas fue el uso de catalasa microencapsulada (Chang y Poznansky, 1968). Más tarde se usaron liposomas cargados con enzima en ciertas enfermedades conocidas como de almacenamiento (Gregoriadis y Ryman, 1972) y más recientemente se ha propuesto el uso de enzimas atrapadas en eritrocitos como otra forma de introducir enzimas defectuosas o ausentes, en tejidos y órganos vitales (Ihler y col, 1973).

La primera enfermedad tratada por fantasmas de eritrocitos fue la enfermedad de Gaucher, que se caracteriza por una acumulación de β -glucocerebrósido en células del sistema retículoendotelial, a causa de una deficiencia hereditaria de la enzima β -glucocerebrosidasa. Los órganos más involucrados son aque-

llos con una gran actividad eritrofagocítica, como bazo, hígado, y médula ósea. Utilizando primero animales de experimentación se investigó si había una incorporación real de los eritrocitos cargados. De Loach y col (1977) encontraron que la mayor incorporación tenía lugar en hígado y bazo, dependiendo de las condiciones, hallando cantidades menores en otros órganos. Ihler y Glew (1977) observaron que ocurría una incorporación significativa en un hepatoma transplantable. Thorpe y col (1975) demostraron que las células cargadas eran rápidamente captadas por el hígado, donde la actividad enzimática se mantenía por 24 horas aproximadamente, detectándose todavía actividad hasta cinco días después.

Beutler y col (1977) trataron con fantasmas de eritrocitos cargados con la enzima deficiente a una paciente con el mal de Gaucher, pero sin resultados satisfactorios, atribuidos posiblemente al hecho de que la paciente se hallaba en un estadio muy avanzado de la enfermedad.

Otra anomalía en la cual se podría aplicar la terapia por reemplazo enzimático es la hiperargininemia familiar con deficiencia innata de arginasa en los eritrocitos. Este es un error en el ciclo de la urea y se caracteriza por la presencia de altas concentraciones de arginina y amoníaco. Se incorporó arginasa de hígado humano en eritrocitos de pacientes genéticamente deficientes en arginasa y simulando condiciones de estudio *in vivo* se observó que la enzima se mantenía funcionalmente activa, si bien la velocidad de entrada del sustrato en los eritrocitos era lenta (Adriaenssens y col, 1976). La asparaginasa libre se elimina con una vida media inicial de aproximadamente 24 horas, aunque la actividad enzimática sigue siendo significativa por diez días.

Ihler y col (1975) utilizaron como sistema modelo, eritrocitos cargados con uricasa. El ácido úrico entra en los eritrocitos normales por un sistema de transporte pasivo. Estudiando el transporte de ácido úrico se demostró que los eritrocitos normales y los fantasmas tenían las mismas constantes cinéticas de entrada y salida, indicando que la hemólisis no había inactivado la proteína transportadora ni creado poros en la membrana a través de los cuales pudiera pasar libremente el ácido úrico. Además las propiedades del sistema de transporte relacionadas con la velocidad, temperatura y concentración de ácido úri

co son las mismas para eritrocitos normales y fantasmas.

Otra enfermedad metabólica hereditaria en la que podría aplicarse el reemplazo enzimático es la hipoxaluria tipo I, que se caracteriza por una acumulación de ácido glioxílico y sus productos de oxidación y reducción, ácido oxálico y ácido glicólico, respectivamente. La terapia con fantasmas de eritrocitos podría conducir a la disminución de la concentración de ácido oxálico o su precursor, el ácido glioxílico en sangre, por encapsulamiento de oxalato dicarboxilasa o glioxilato reductasa.

Hubbard y col (1980) han demostrado que el transporte de ácidos orgánicos a través de las membranas de fantasmas y eritrocitos normales se realiza de manera similar.

Mulder y col (1973) prepararon fantasmas de eritrocitos conteniendo globulina unida a corticosteroides y pudieron atrapar esteroides dentro de los eritrocitos. Como era de esperar, la velocidad de entrada era rápida para esteroides no conjugados (no-cargados) y mucho menor para esteroides conjugados. Mulder y col (1972) incorporaron 17- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa en eritrocitos y observaron que era capaz de llevar a cabo su función enzimática usando sustrato extracelular. De manera que los eritrocitos así cargados podrían utilizarse terapéuticamente en desórdenes endócrinos.

Se administró desferroxamina, una droga quelante de hierro, incorporada en fantasmas de eritrocitos en forma iv, a pacientes con un exceso de hierro depositado a diferentes niveles y con distintos diagnósticos. La terapia con fantasmas de eritrocitos mejoró la eficiencia de la quelación, especialmente en pacientes que presentaban sólo ligeros aumentos de depósito de hierro. En todos los pacientes, la desferroxamina incorporada en fantasmas incrementó la excreción urinaria de Fe con respecto a la acción de la desferroxamina suministrada por vía subcutánea (Green y col, 1980).

Es bien conocido que las porfirias se caracterizan por una acumulación de precursores y/o porfirinas en tejidos, sangre, orina y heces. Una anomalía bioquímica importante en la intoxicación por plomo es una elevada concentración de ácido δ -aminolevúlico (ALA), fácilmente detectable en orina, como consecuencia de la inhibición del ALA-Dehidrasa (ALA-D) por el

metal. Por eso es que proponemos el uso de la enzima encapsulada en eritrocitos como una posible y atractiva terapéutica en la intoxicación por Pb. De esta manera, la enzima podría alcanzar los sitios deseados, siendo transportada por las mismas células en las cuales tiene lugar el desorden metabólico.

REFERENCIAS

- Addriaenssens, K.; Karcher, D.; Lowenthal, A. & Terheggen, H.G. (1976) Clin. Chem. 22, 323.
- Akerblom, O.; de Verdier, C.H. & Finnson, M. (1967) Transfusion 7, 1.
- Ang, E.; Glew, R. & Ihler, G. (1977) Expl. Cell Res. 104, 430.
- Baker, R.F. (1967) Nature (London) 215, 424.
- Baker, R.F. & Gillis, N.R. (1969) Blood 33, 170.
- Bessis, M. (1973) en "Living Blood Cells and Their Ultrastructure" Springer-Verlag, Berlín, New York.
- Beutler, E.; Dale, G.L.; Guinto, E. & Kuhl, W. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4620.
- Bodemann, H. & Passow, H. (1972) J. Membrane Biol. 8, 1.
- Bretscher, M.S. (1973) Science (N.Y.) 181, 622.
- Conway, E.J. & Cooke, R.B. (1939) Biochem. J. 33, 479.
- Chang, T.M.S. (1972) En "Artificial Cells", Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- Chang, T.M.S. & Poznansky, M.J. (1968), Nature 218, 243.
- Dale, G.L.; Villacorte, D.G. & Beutler, E. (1977) Biochem. Med. 18, 220.
- Danon, D. (1961) J. Cell Comp. Physiol. 57, 111.
- De Loach, J.; Peters, S.P.; Pinkard, O.; Glew, R. & Ihler, G. (1977) Biochim. Biophys. Acta 496, 507.
- Fisher, K.A. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 73, 173.
- Ganzoni, A.; Oakes, R. & Hillman, R. (1971) J. Clin. Invest. 50, 1273.
- Gárdos, G. (1954) Acta Physiol. Acad. Sci. Hungary 6, 191. Citado por Gouley, D. (1957) J. Appl. Physiol. 10, 511.
- Green, R.; Lamon J. & Curran, D. (1980) Lancet, 327.
- Gregoriadis, G. (1976) New Engl. J. Med. 295, 704 y 765.
- Gregoriadis, G. & Ryman, B.E. (1972) Eur. J. Biochem. 24, 485.
- Heedman, P. (1958) Expl. Cell Res. 14, 9.

- Hershko, A.; Razin, A.; Shoshani, T. & Mayer, J. (1967) Biochim. Biophys. Acta 149, 59.
- Hoffman, J.F. (1958) J. Gen. Physiol. 42, 9.
- Hoffman, J.; Tosteson, D. & Whittam, R. (1960) Nature 185, 186.
- Hoffman, J. (1962) J. Gen. Physiol. 45, 837.
- Hubbard, A.R.; Sprandel, U. & Chalmers, R.A. (1980) Biochem. J. 185, 653.
- Ihler, G. (1973) En "Drug Carriers in Biology and Medicine" Ed. G. Gregoriadis. Academic Press p. 129-153.
- Ihler, G.; Glew, R. & Schnure, R. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. , USA 70, 2663.
- Ihler, G.; Lantay, A.; Purpura, J. & Glew, R. (1975), J. Clin. Invest. 56, 595.
- Ihler, G. & Glew, R. (1977) En "Biochemical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins" Vol I, Plenum Press. New York.
- Jacobasch, G.; Minakami, S. & Rappart, S. (1974) En "Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes". Ed. H. Yoshikawa and S.M. Rapoport, University Park Press. Baltimore.
- Lassen, U.V. (1967) Biochim. Biophys. Acta 135, 146.
- Lepke, S. & Passow, H. (1972) Biochim. Biophys. Acta 255, 696.
- Lionetti, F.J. & Fortier, N.L. (1963) Arch. Biochem. Biophys. 103,15.
- Lowy, B.A. & Dorfman, B.Z. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3043.
- Mulder, E.; Lamers-Stahlhofen, G.J.M. & van der Molen, H.J. (1972) Biochim. Biophys. Acta 260, 290.
- Mulder, E.; Lamers-Stahlhofen, G.J.M. & van der Molen, H.J. (1973) J. Steroid Biochem. 4, 369.
- Murphy, J.R. (1960) J. Lab. Clin. Med. 55, 286.
- Murphy, J.R. (1965) J. Lab. Clin. Med. 65, 756
- Nakao, M.; Nakao, T. & Yamazoe, S. (1960 a) Nature (London) 187, 945.
- Nakao, M.; Nakao, T.; Tatibana, M. & Yoshikawa, H. (1960 b) J. Biochem. 47, 661.

- Nakao, M.; Nakao, T.; Yamazoe, S. & Yoshikawa, H. (1961) J. Biochem. 49, 487.
- Neufeldt, E.F.; Lim, T.W. & Schapiro, L.J. (1975) En "Annual Review of Biochemistry", vol 44, 357. Annual Reviews, Inc. Palo Alto.
- Pace, M; Brenna, O.; Guglielmo, G.; Pieta, P. & Rossi-Bernardi, L. (1974) En " Insolubilized Enzymes" . Eds. M. Salmons, C. Saronio y S. Garattini. Raven Press, New York.
- Rechsteiner, M. (1978) Natl. Cancer Inst. Monograph 48, 57.
- Rice, W.R. & Steck, T.Z. (1976) Biochim. Biophys. Acta 433, 39.
- Seeman, P. (1967) J. Cell Biol. 32, 55.
- Schrier, S. (1963) J. Clin. Invest. 42, 756.
- Steck, T. (1974) En "Methods in Membrane Biology" Ed. E. Korn. Vol. 2. Plenum Press, New York.
- Thorpe, S.R.; Fiddler, M.B. & Desnick, R.J. (1975) Biochem. Biophys. Commun. 61, 1464.
- Wagner, H.; Razzak, M. ; Gaertner, R.; Caine, W. & Feagin, O. (1962) Arch. Int. Med. 110, 90.
- Weed, R.; Reed, C. & Berg, G. (1963) J. Clin. Invest. 42, 581.
- Weed, R.I.; La Celle, P.L. & Merrill, E.W. (1969) J. Clin. Invest. 48, 795.
- Whittam, R. & Ayer, M. (1965) Biochem. J. 97, 214.
- Winter, C.G. & Christiansen, H.N. (1964) J. Biol. Chem. 239, 872..

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

M.I.	Reactivos	160
M.II.	Purificación de enzimas	160
M.II.1.	Aminolevúlico-Dehidrasa (ALA-D)	160
M.II.2.	Rodenasa	161
M.II.3.	Deaminasa	161
M.III.	Experiencias con fantasmas	162
M.III.1.	Muestras de sangre	162
M.III.1.1.	Obtención	162
M.III.1.2.	Preparación	163
M.III.2.	Tejidos. Preparación de los homogenatos	163
M.IV.	Determinación de hemoglobina	163
M.V.	Sistemas de incubación y determinación de la actividad enzimática	164
M.V.1.	ALA-D	164
M.V.2.	Rodenasa	165
M.V.3.	Deaminasa	166
M.VI.	Determinación de la concentración proteica	167
M.VII.	Preparación de los hemolizados	167
M.VIII	Derivados oxidados de Sephadex	168
M.VIII.1.	Obtención	168
M.VIII.1.1	Sephadex oxidado	168
M.VIII.1.2	Sephadex oxidado-Etilendiamina	168
M.VIII.2.	Solubilización	169
M.VIII.3.	Acoplamiento de las enzimas	169
M.VIII.3.1	Sobre Sephadex oxidado	169
M.VIII.3.1.1.	ALA-Dehidrasa y Rodenasa	169
M.VIII.3.1.2.	Deaminasa	170
M.VIII.3.2	Sobre Sephadex-Etilendiamina	170
M.VIII.3.2.1.	ALA-Dehidrasa	170
M.VIII.3.2.2.	Deaminasa	171
M.IX.	Preparación de fantasmas de eritrocitos	171

M.X.	Efecto <i>in vitro</i> del agregado de fantasmas de eritrocitos cargados con enzima, a glóbulos rojos de intoxicados con Pb	172
M.XI.	Preparación de fantasmas de eritrocitos autólogos humanos cargados con ALA-D	172
	Referencias	173

M.I. REACTIVOS

La mayoría de los reactivos fueron obtenidos de Sigma Chem. Co. o Merck.

Los geles de Sephadex y Sepharosa fueron de Pharmacia Fine Chem. , Uppsala.

M.II. PURIFICACION DE ENZIMAS

Salvo se indique lo contrario, todas las operaciones se realizaron entre 0-5 °C.

M.II.1. Aminolevúlico-Dehidrasa (ALA-D)

Fuentes: Eritrocitos:

- a) Humanos: Se trabajó con sangre venosa de dadores voluntarios normales, del Hospital Ramos Mejía, Buenos Aires, obtenida en las condiciones usuales.
- b) Conejos: La sangre se obtuvo desangrando un conejo, previamente anestesiado con pentobarbital, por punción cardíaca.

En ambos casos la sangre se recogió sobre heparina (0,1 ml de heparina, 12,5 mg/ml de solución fisiológica, por cada 10 ml de sangre), se centrifugó a 600xg aproximadamente, se descartó el plasma, y los glóbulos rojos (GR) se lavaron con solución fisiológica.

Se eliminó la Hb utilizando la técnica de Scott (1976) modificada según se indica más adelante, y la enzima se purificó finalmente por el procedimiento descripto en Resultados (Bustos y col, 1980), empleando como última etapa una cromatografía por afinidad en una columna de Sepharosa-etilendiamina-ALA, obtenida de acuerdo con la técnica desarrollada por Stella y Batlle (1977).

M.II.2. Rodenasa

La Rodenasa se preparó a partir de *Rp. spheroides* y se midió con el procedimiento descrito por Wider de Xifra y col (1976).

Se cosechó un cultivo de esta bacteria fotosintética por centrifugación a 11.000xg durante 10 minutos. La masa resultante se suspendió en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4, hasta que a una dilución de 1:200 corresponda una absorbancia de 0,500 a 680 nm.

Fracciones de 6 ml de esta suspensión se sonicaron durante un tiempo total de 2 minutos, en 4 intervalos de 30 segundos. El homogenato así obtenido se diluyó al tercio con el mismo buffer y se centrifugó a 100.000xg durante 70 minutos; se descartó el pellet, y el sobrenadante se trató con ácido acético glacial hasta llegar a pH 5,0; la mezcla se dejó agitando por 30 minutos y luego se centrifugó 10 minutos a 11.000xg. El sobrenadante se fraccionó con sulfato de amonio, empleándose como fuente de Rodenasa la fracción 55-70% de saturación.

M.II.3. Deaminasa

Se preparó un homogenato de hígado vacuno al 10% (p:v) en sacarosa 0,25 M. Se centrifugó 20 minutos a 12.000 rpm, descartándose el pellet. Al sobrenadante se le agregó ácido acético glacial hasta pH 5,0 y se dejó agitando durante 20 minutos. Luego se centrifugó 20 minutos a 12.000 rpm y se descartó el precipitado.

El sobrenadante se fraccionó entre 45-70% de saturación con sulfato de amonio. Se pasó luego por una columna de Sephadex G-25 equilibrada con buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4 para eliminar el amonio y se calentó entre 65-70 °C durante 20 minutos. Se centrifugó 20 minutos a 12.000 rpm, concentrándose el sobrenadante por precipitación con sulfato de amonio hasta 70% de saturación. El precipitado proteico se resuspendió en el mínimo volumen de buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4 y se filtró, como antes, por Sephadex G-25.

M.III. EXPERIENCIAS CON FANTASMAS

M.III.1. Muestras de sangre

M.III.1.1. Obtención

- a) Humana: La sangre normal se obtuvo del Banco de Sangre del Hospital Ramos Mejía.
Las muestras de sangre intoxicada con plomo se obtuvieron de varios pacientes ocupacionalmente expuestos al plomo.
- b) Conejos: Se usaron conejos blancos machos (12 a 15 meses de edad), cuyo peso oscilaba entre 4 y 5 kg. Un grupo se empleó como control y el otro recibió 500 mg/l de acetato de plomo en el agua de bebida durante siete días, luego la dosis se redujo a la mitad y se sacrificaron cuando la actividad del ALA-D estaba reducida en un 50%.
- c) Ratas: Se usaron ratas Sprague-Dawley macho (de 9 a 12 meses de edad), de un peso promedio de 500 g. También fueron divididas en dos grupos, uno se inyectó intraperitonealmente con 2 mg/kg de acetato de plomo, dos veces, 15 y 2 horas antes de ser sacrificadas. Las ratas control no se trataron.
- d) Ratones: Los ratones, cepa CFW, del Instituto de Farmacología de Buenos Aires, y cepa CF1, del Centro Panamericano de Zoonosis, cuyo peso promedio era de 25-30 g, recibieron una dosis intraperitoneal de 2 mg/kg de acetato de plomo y se sacrificaron 20 horas después. El otro grupo de ratones se empleó como control.

Todos los animales fueron alimentados con dieta normal para animales de laboratorio y recibieron agua ad libitum.

El grado de intoxicación por Pb se controló midiendo los niveles de ALA-D en eritrocitos.

A los conejos se les extrajo la sangre por la vena de la oreja, recogiéndola sobre heparina. Las ratas y los ratones fueron sacrificados y se recogió la sangre directamente del corazón con jeringas heparinizadas.

M.III.1.2. Preparación

Los eritrocitos, separados por centrifugación, se lisisaron por congelamiento y descongelamiento tres veces, o por tratamiento con Tritón X-100 0,5% (concentración final). Los ER humanos se diluyeron 1:15 y los de ratón 1:5 en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 6,8.

M.III.2. Tejidos. Preparación de los homogenatos

Los órganos de los ratones, hígado, riñón y bazo, se pesaron, se cortaron en trozos pequeños, se lavaron 3 veces con NaCl 0,9% frío y se homogeneizaron en sacarosa 0,25 M en potter de vidrio con émbolo de teflón, en la relación 1:10 (p:v). El homogenato así obtenido se centrifugó 20 minutos a 10.000 rpm y se utilizó el sobrenadante como fuente enzimática.

M.IV. DETERMINACION DE HEMOGLOBINA

La hemoglobina (Hb) se determinó por el método de la cianometahemoglobina, utilizando el reactivo de Drabkin, que consiste en: 200 mg de ferricianuro de potasio, 50 mg de cianuro de potasio, 140 mg de fosfato diácido de potasio y 1 ml de un detergente no iónico, en 1000 ml de agua destilada. Se agregan 0,02 ml de la solución que contiene hemoglobina a 5,0 ml del reactivo, y luego de mezclado, a partir de los 2 minutos, se lee la absorbancia a 540 nm en un espectrofotómetro, contra un blanco de reactivo.

Este método se basa en el hecho de que la cianometahemoglobina formada por la acción complejante del cianuro sobre la hemoglobina oxidada ya por el ferricianuro, puede medirse espectroscópicamente con facilidad.

M.V. SISTEMAS DE INCUBACION Y DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

M.V.1. ALA-D

La actividad se determinó de acuerdo con el método de Batlle y col (1967).

a) Para la enzima purificada

El sistema de incubación contiene: 0,1 ml de enzima, 0,1 ml de buffer fosfato de Na 1 M pH 6,8; 0,1 ml de cisteína (CiSH) 0,25 M; 0,1 ml de ALA 0,05 M y agua hasta un volumen final de 1,9 ml. Luego de una hora de incubación a 37 °C la reacción se detiene por el agregado de 0,1 ml de una solución saturada de sulfato de cobre.

Cuando se estudió el efecto de metales, se agregó al sistema de incubación 0,2 ml de una solución de una sal del metal de la concentración correspondiente indicada en cada caso, antes del agregado del ALA.

Cuando se estudió el efecto de protectores de grupos sulfhidrilo, se agregó 0,1 ml de una solución del tiol de la concentración indicada, antes del agregado del ALA, excepto en el caso de máxima concentración (10^{-1} M), en que se usó 1 ml. El volumen final fue en todos los casos de 2,0 ml.

El contenido de PBG se determinó mediante la reacción de Ehrlich (Moore y Labbe, 1964), aplicando la siguiente expresión para su cálculo:

$$\text{nmoles PBG/ml enz.} = \frac{A \times \text{dil.} \times \text{Vol. inc.} \times 10^6}{\epsilon \times \text{PM} \times \text{Vol. enz.}}$$

donde $\epsilon = 113,6$

PM = 226

A = Absorbancia a 555 nm

Vol. inc. = Volumen final de incubación

Vol. enz. = Volumen de enzima

Se define como una unidad enzimática al número de nmoles de PBG formados por ml de enzima en 1 hora a 37 °C en las condi-

ciones standard descriptas, y la actividad específica como el número de unidades por mg de proteína.

b) Para la enzima cruda

Cuando se trabajó con sistemas crudos, como por ejemplo GR, fantasmas y homogenatos, el sistema de incubación contenía: 0,5 ml de enzima; 0,1 ml de buffer fosfato de Na 1 M pH 6,8; 0,1 ml de ALA 0,05 M y agua hasta un volumen final de 2,0 ml. Luego de 1 hora de incubación a 37 °C, la reacción se detuvo por el agregado de 0,2 ml de TCA 50%.

El PBG formado se determinó de la misma manera que para los sistemas purificados.

c) Para el complejo gel-enzima

A 1 ml de gel suspendido en 0,3 ml de buffer fosfato de sodio 0,5 M pH 6,8, se le añaden 0,15 ml de CiSH 0,25 M y 1,25 ml de agua. La mezcla se preincuba 15 minutos a 37 °C. Se agregan luego 0,15 ml de ALA 0,05 M y se incuba 1 hora a 37 °C con agitación constante. La reacción se detiene por la adición de 0,15 ml de una solución saturada de sulfato de cobre. Se centrifuga, y en el sobrenadante se determina el PBG formado como antes.

M.V.2. Rodenasa

El sistema empleado se basa en el desarrollado por Sörbo (1957).

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 2 ml: buffer Tris-HCl pH 8,7: 100 μmoles ; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 100 μmoles ; NaCN: 100 μmoles de una solución que contiene 0,4 moles de HCl/mol de cianuro, y la solución enzimática, completándose el volumen con agua destilada.

La reacción fue iniciada por el agregado de NaCN incubándose por 30 minutos a 37 °C, y se detuvo por el agregado de 0,2 ml de formol 38% y 1 ml de reactivo férrico (10 g de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ + 20 ml de HNO_3 (c), llevados a 100 ml con agua destilada).

Luego de centrifugar 15 minutos a 6.000 rpm, se leyó la absorbancia a 460 nm.

Los valores de tiocianato formados se obtuvieron de curvas de calibración realizadas con NaSCN 1 mM.

M.V.3. Deaminasa

Se siguió la metodología descrita por Sancovich y col (1969), disminuyendo el volumen total de los incubados a 2 ml.

El sistema de incubación contenía: 1 ml de enzima (en buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4); 50 µg de PBG en el mismo buffer; NaCl 0,6 M: MgCl₂ 0,12 M (1:1) en la relación 0,2 ml/ml de incubado; se llevó a 2 ml con el buffer mencionado.

Las condiciones de incubación fueron: aerobiosis, oscuridad, 37 °C y 2 horas, con agitación mecánica constante.

En todas las experiencias se realizaron blancos de enzima, a tiempo 0 y de sustrato.

Finalizada la incubación, se precipitó la proteína por agregado de un volumen de HCl (c) tal que la concentración final fuese del 5%. Posteriormente, la mezcla se iluminó durante 20 minutos para oxidar los porfirinógenos a porfirinas. El precipitado se filtró a través de papel plegado, lavándose una vez con 1 ml de HCl 5%.

La cantidad total de porfirinas formadas presente en los incubados, se determinó espectrofotométricamente en el filtrado ácido, empleando la fórmula corregida de Rimington y Sveinsson (1950):

$$\text{nmoles de porfirinas/ml enzima} = \frac{(2A^{\text{máx}} - A^{380} - A^{430}) \times \text{dil} \times V_f \times 1,008}{\text{Venz.}}$$

M.VI. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION PROTEICA

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry y col (1951).

M.VII. PREPARACION DE LOS HEMOLIZADOS

Para determinar el efecto del plasma sobre la inhibición por Pb, se emplearon hemolizados obtenidos por los siguientes procedimientos:

- a) Por congelamiento y descongelamiento tres veces: HC₃. El congelamiento se realizó en congeladora a - 20 °C y el descongelamiento, en agua a temperatura ambiente. El hemolizado resultante se diluyó 3 veces con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 6,8.
- b) Por lisis osmótica: Se prepararon tres tipos de hemolizados. Una fracción de GR se diluyó 1:3 con agua destilada, procediéndose a realizar los siguientes tratamientos:
 - Agitación: el hemolizado HLa se obtuvo por agitación mecánica durante 30 minutos en baño de hielo.
 - Sonicación: Los hemolizados HLa se obtuvieron por sonicación en baño de hielo. El HLa_{30"} correspondió a una sonicación de 30 segundos y el HLa_{60"}, a dos períodos de 30 segundos cada uno.

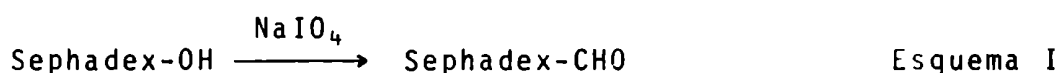
El plasma se desproteinizó calentando 3 minutos a 100 °C. Se separó el precipitado por centrifugación y se utilizó el sobrenadante.

M.VIII. DERIVADOS OXIDADOS DE SEPHADEX

M.VIII.1. Obtención

M.VIII.1.1. Sephadex oxidado

La oxidación del Sephadex G-25 se llevó a cabo suspendiendo el gel en buffer acetato 0,1 M pH 4,0 (10 ml/ml gel) y haciéndolo reaccionar con periodato de sodio 50 mM (10 ml/ml gel) durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación (Esquema I)



El gel se lavó con agua y etilenglicol 0,1 M (50 ml/ml gel), para eliminar el exceso de periodato de sodio.

El grado de oxidación se determinó dosando el formaldehído presente en el sobrenadante.

El periodato de sodio remanente se determinó por absorbancia a 223 nm y se graficó como tal.

Dosaje de formaldehído: Se utilizó el método de Corcoran y Page (1947). A 1 ml del sobrenadante se le agregan 0,4 ml de AsO_4Na y 0,5 ml de H_2SO_4 0,5 M. Se deja reposar 30 minutos a temperatura ambiente para luego añadir 10 ml de ácido cromotrópico (4,5-dihidroxi-2,7-naftalene disulfónico) en solución de H_2SO_4 ; se somete la mezcla a ebullición durante 30 minutos. La presencia de formaldehído confiere una coloración violeta a la solución, lo cual permite su cuantificación espectrofotométrica a 570 nm.

M.VIII.1.2. Sephadex oxidado-Etilendiamina

Se agrega al gel oxidado una solución de etilendiamina 0,1 M en buffer bicarbonato 0,1 M pH 9,0 en relación 2 ml/ml gel y se agita a temperatura ambiente. A los tiempos 20 y 40 minutos se añade KBH_4 (0,25 mg/ml gel). 20 minutos después de la segunda adición de KBH_4 se lava con H_2O (50 ml/ml gel), NaHCO_3 1% y H_2O (50 ml/ml gel) (Liberatore y col, 1976).

M.VIII.2. Solubilización

El Sephadex G-25, oxidado con periodato de sodio 0,2 M durante 30 minutos, se lavó con agua (50 ml/ml gel), etilenglicol 0,1 M (50 ml/ml gel) y agua (50 ml/ml gel).

Se intentó solubilizarlo suspendiéndolo en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 8,0 y 7,4. Se mantuvo en tubos de ensayo o erlenmeyers a 37 °C durante tiempos variables: 2, 4, 6, 24 y 48 horas. El grado de solubilización se determinó por diferencia de peso del gel antes y después del estacionamiento, previa centrifugación de la suspensión, y midiendo la concentración de grupos carbonilos en el sobrenadante, en base a la lectura de la absorbancia a 240 nm, que se graficó como tal.

M.VIII.3. Acoplamiento de las enzimas

M.VIII.3.1. Sobre Sephadex oxidado

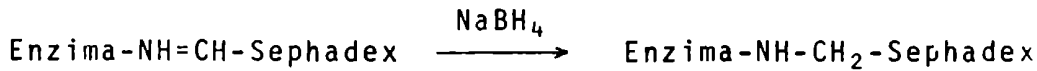
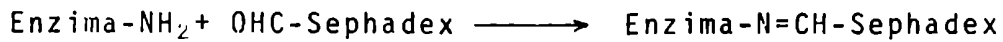
M.VIII.3.1.1. ALA-Dehidrasa y Rodenasa :

Se llevó a cabo agregando el Sephadex oxidado a diferentes cantidades de enzima suspendida en buffer fosfato 0,05 M pH 6,8 (1:5) (v:v), a 4 °C durante 30 minutos con agitación.

Se agregó NaBH₄ (0,25 mg/ml gel) luego de 20 y 40 minutos. Veinte minutos después del último agregado, la reacción se detuvo destruyendo el exceso de NaBH₄ con ácido acético 0,1 M.

La enzima que no se hubiera unido covalentemente al soporte, se elimina lavando con 100 ml de agua, 100 ml de KCl 2 M y 100 ml de agua. La cantidad de enzima unida al soporte se determinó estableciendo la diferencia entre la cantidad de enzima agregada al Sephadex oxidado y la cantidad presente en los lavados.

La enzima se acopla al soporte sólido por medio de la formación de una base de Schiff entre los grupos ε-amino de los residuos lisina y grupos aldehído del Sephadex oxidado, de acuerdo al Esquema II:



Esquema II

Para determinar la actividad de la enzima inmovilizada se usaron las mismas condiciones de incubación que para la enzima soluble, con las modificaciones descritas por Stella y col (1977).

M.VIII.3.1.2. Deaminasa

A 1 g (aproximadamente 4 ml) de Sephadex G-25 oxidado, se le agregan 44 mg de proteína, suspendida en 7,5 ml de buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4.

Se deja agitando 3 horas a 0 °C, transcurridas las cuales se agregan 2 porciones de KBH_4 (0,25 mg/ml gel) con un intervalo de 20 minutos. Luego de 20 minutos de la segunda adición, se centrifuga y el gel se lava 2 veces con buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4. El sobrenadante y los lavados se dializan una noche contra buffer TRIS-HCl 0,01 M pH 7,4 para eliminar el KBH_4 .

El gel se lava con agua, bicarbonato de sodio 1% y agua (50 ml/ml gel en cada caso).

M.VIII.3.2. Sobre Sephadex-Etilendiamina

M.VIII.3.2.1. ALA-Dehidrasa

Al Sephadex-etilendiamina, resuspendido en buffer fosfato de sodio 0,1M pH 5,7, se le añade la enzima (10 ml/ml gel). Luego se agregó lentamente la carbodiimida (50 mg/ml gel) disuelta en 1 ml de agua. La mezcla se dejó agitando a 0 °C durante 5 horas.

Al cabo de este período, se centrifugó y el gel se lavó 2 veces con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 6,8. El sobrenadante y los lavados se dializaron contra buffer fosfato 0,01 M pH 6,8

durante una noche, para eliminar el exceso de carbodiimida que se sabe inactiva la enzima.

El gel se lavó con agua, bicarbonato de sodio 1% y agua (50 ml/ml gel en cada caso).

M.VIII.3.2.2. Deaminasa

Para acoplar la Deaminasa a Sephadex-etilendiamina, se agregaron 4 ml de enzima (aproximadamente 20 mg), a 4 ml de gel y se llevó a pH 5 con HCl 0,2 M. Luego se añadieron 200 mg de carbodiimida disueltos en 1,5 ml de agua. Se mantuvo 5 horas a 0 °C con agitación.

La reacción se detuvo centrifugando el gel y lavándolo 2 veces con buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4. El sobrenadante y los lavados se dializaron durante una noche contra buffer TRIS-HCl 0,01 M.

El gel se lavó con agua, bicarbonato de sodio 1% y agua (50 ml/ml gel en cada caso).

M.IX. PREPARACION DE FANTASMAS DE ERITROCITOS

Se obtuvieron de acuerdo al método de Ihler y col (1975) con las modificaciones indicadas.

Excepto se indique lo contrario, el procedimiento final para obtener fantasmas de glóbulos rojos (FGR) fue el siguiente:

La sangre se centrifugó 5 minutos a 1000xg y 4 °C, descartándose el suero y los glóbulos blancos. Los eritrocitos se lavaron tres veces con solución isotónica de NaCl. En una experiencia tipo, se agregó 1 ml de GR a 3 ml de agua destilada, con teniendo o no 0,1-0,2 ml de solución enzimática (aproximadamente 1.200 U/ml - 0,2 mg prot/ml). Esta suspensión permaneció a 0 °C durante 5 minutos con agitación suave y constante. Al final de esta hemólisis hipotónica se restauró la isotonicidad agregando 0,33 ml de NaCl 9%, permitiendo el resellado de los eritrocitos durante 5 minutos a 4 °C. Luego los fantasmas de eritrocitos se centrifugaron y lavaron 3 veces con buffer fosfato salino (buffer fosfato de sodio 0,01 M pH 6,8 conteniendo NaCl 140 mM), suspen

dados en la misma solución de buffer salino, se mantuvieron a 4 °C, y usaron dentro de las dos horas siguientes.

En los sobrenadantes y las células reselladas se determinaron siempre la actividad de ALA-D, y contenido proteico y de Hb.

M.X. EFECTO *in vitro* DEL AGREGADO DE FANTASMAS DE ERITROCITOS CARGADOS CON ENZIMA, A GLOBULOS ROJOS DE INTOXICADOS CON Pb

Luego de preparados los fantasmas cargados con enzima según se ha descrito, se tomó una alícuota de GR intoxicados con Pb, previamente lavados 3 veces con solución fisiológica, y se los mezcló: con fantasmas de eritrocitos normales cargados con ALA-D (FGR_n(ALA-D) y con fantasmas de eritrocitos intoxicados con Pb cargados con ALA-D (FGR_i(ALA-D)), en las relaciones variables indicadas.

Las mezclas resultantes se hemolizaron por congelamiento y descongelamiento 3 veces y se diluyeron 1:5 con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 6,8.

La actividad enzimática se determinó como ya se indicó.

M.XI. PREPARACION DE FANTASMAS DE ERITROCITOS AUTOLOGOS HUMANOS CARGADOS CON ALA-D

Los fantasmas de eritrocitos conteniendo ALA-D (FGR(ALA-D)) se prepararon con 500 ml de sangre del mismo paciente y ALA-D purificada de sangre humana, siguiendo la técnica antes descrita. Se obtuvieron 100 ml de fantasmas cargados, que se suspendieron en igual volumen de solución salina isotónica (actividad 2,47 U/mg ó 128,4 U/ml) y se administraron al paciente por transfusión endovenosa, en un tiempo de cerca de 2 horas. El proceso total llevó 10 horas.

Determinación de precursores, porfirinas y Pb

Las porfirinas y el PBG se midieron por el método de Rimington (1971) y el ALA por el de Mauzerall y Granick (1956).

El Pb en sangre se determinó por espectroscopía de absorción atómica siguiendo un proceso similar al descrito por Kesten y col (1980).

Preparación de la columna por cromatografía de afinidad

El absorbente bioespecífico, H00C-ALA-Succinil-Aminoetil-Sepharosa (H00C-ALA-S-AE-Sepharosa) se preparó de acuerdo con la técnica de Stella y Batlle (1977).

REFERENCIAS

- Batlle, A.M. del C.; Ferramola, A.M. & Grinstein, M. (1967) Biochem. J. 104, 244.
- Bustos, N.L.; Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 745.
- Carcoran, A.C. & Page, I.H. (1947) J. Biol. Chem. 170, 165.
- Ihler, G.; Lantzy, A.; Purpura, J. & Glew, R. (1975) J. Clin. Invest. 56, 595.
- Liberatore, P.A.; Mc Isaac, J.E. & Royer, G. (1976) FEBS Letters, 68, 45,
- Lowry, O.; Rosenbrough, N.; Farr, L. & Randall, R. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
- Moore, M. & Labbe, R. (1964) Clin. Chem. 10, 1105.
- Rimington, C. & Sveinsson, S.L. (1950) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 2, 209.
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969) Biochim. Biophys. Acta 191, 130.
- Scott, J.(1976) Prep. Biochem. 6, 147.
- Sörbo, B.H. (1957) Acta Chem.Scand. 7, 32.
- Stella, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1977) Int. J. Biochem. 8, 353.
- Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1977) Mol. Cell Biochem. 16, 97.
- Wider de Xifra, E.A.; Sandy, J.; Davies, R. & Neuberger, A. (1976) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 273, 79.
- Kesten, E.M.; Stella, A.M.; Wider, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 905.
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1956) J. Biol. Chem. 219, 435.
- Rimington, C. (1971) Assoc. of Clin. Path-Broadsheet 70 (Revised Broadsheet 36).
- Stella, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1977) Int. J. Biochem. 8, 353.

RESULTADOS Y DISCUSION

PARTE I

ESTUDIOS SOBRE EL ALA-D DE ERITROCITOS HUMANOS

ESTUDIOS SOBRE EL ALA-D DE ERITROCITOS HUMANOS

I.1. Actividad del ALA-D en distintos preparados de glóbulos rojos	175
I.2. Aislamiento, purificación y peso molecular	176
I.3. Propiedades	179
I.3.1. Efecto de la atmósfera y protectores de grupos sulfhidrilos	179
I.3.2. Efecto de inhibidores de grupos sulfhidrilos y su reversión por cisteína	181
I.3.3. Curva de saturación por sustrato - Km	182
I.3.4. pH óptimo	183
I.3.5. Acción de cationes monovalentes	184
I.3.6. Acción del Pb y los cationes divalentes Zn, Fe	186
I.3.6.1. Curva de saturación por Pb	186
I.3.6.2. Cinética de inhibición por Pb	187
I.3.6.3. Efecto del plasma sobre la inhibición por Pb	187
I.3.6.4. Curva de saturación por Zn	191
I.3.6.5. Efecto combinado Pb-Zn	192
I.3.6.6. Curva de saturación por Fe	193
I.3.6.7. Efecto combinado Pb-Fe	193
I.4. Conclusiones	194

I.1. ACTIVIDAD DEL ALA-D EN DISTINTOS PREPARADOS DE GLOBULOS ROJOS

Con el objeto de determinar el método de hemólisis más conveniente, se ensayaron tres tipos de procedimientos: i) con gelamiento y descongelamiento 3 veces (HC_3); ii) lisis osmótica (HL_a) y iii) lisis por sonicación ($HL_{b30''}$ y $HL_{b60''}$), según se describe en Materiales y Métodos. También se midió la actividad de los glóbulos rojos (GR) y sangre enteros. Todas las determinaciones de actividad se llevaron a cabo en presencia y ausencia de CiSH.

Como puede verse en la Figura 1, no se detectó actividad en los GR y sangre enteros. La CiSH estimula la actividad en todos los casos, observándose los mayores valores para los hemolizados HC_3 y $HL_{b60''}$.

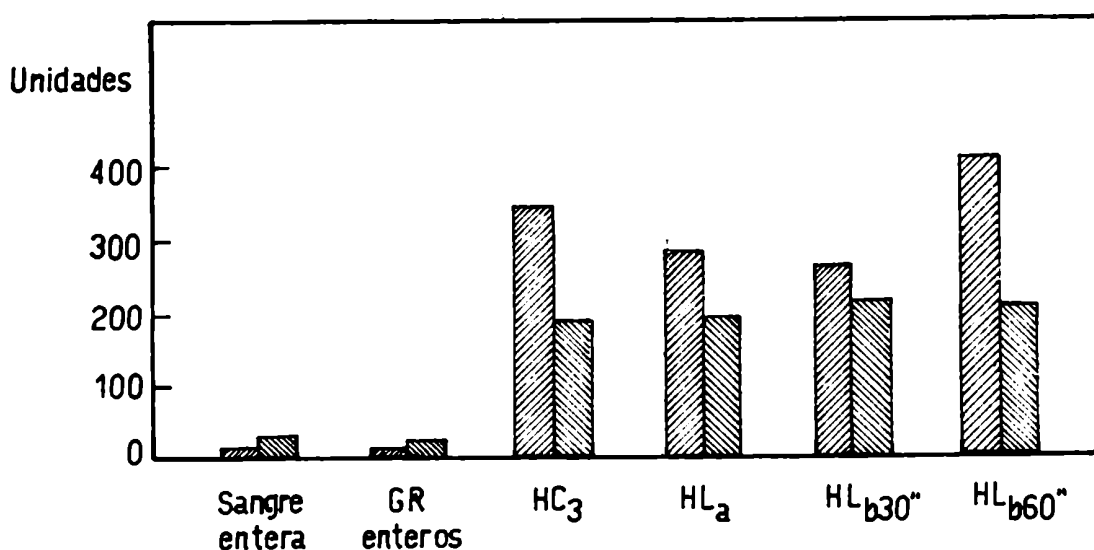




FIGURA 1: Actividad del ALA-D de sangre entera, glóbulos rojos enteros y distintos tipos de hemolizados, con () y sin () CiSH. Los diferentes hemolizados se obtuvieron según se detalla en Materiales y Métodos. Tanto éstos como los GR enteros se diluyeron 3 veces, mientras que para la sangre entera, la dilución fue de 2 veces.

En base a estos datos, se seleccionó al HC_3 como el sistema más conveniente para estos estudios.

I.2. AISLAMIENTO, PURIFICACION Y PESO MOLECULAR

Purificación del ALA-D (Tabla I)

Primer paso: Tratamiento con solventes orgánicos: Se llevaron a cabo una serie de ensayos preliminares con el objeto de determinar las condiciones óptimas para eliminar la hemoglobina (Hb), tales como la composición de la mezcla n-butanol-cloroformo, el volumen que debía añadirse a 1 volumen de GR, temperatura y tiempo de mezcla; buffer y período de diálisis. De acuerdo con los resultados obtenidos se adoptó el siguiente procedimiento: los GR obtenidos luego de centrifugar la sangre entera, se lavaron 2 veces con solución isotónica de NaCl y se llevaron a pH 8,0 con hidróxido de amonio concentrado. Luego se añadió a los GR una mezcla fría (-20 °C) de n-butanol y cloroformo (1:0,4 v/v) en la relación de 0,2 volúmenes de mezcla por cada volumen de GR, con agitación mecánica vigorosa, a 4-6 °C en un lapso de 15 minutos. La mezcla resultante se dejó 60 minutos en baño de agua a 20 °C y luego se centrifugó a 24.000xg durante 20 minutos. El sobrenadante se dializó durante 18-20 horas contra buffer fosfato de sodio 0,01 M pH 6,8 (1:200, v/v).

Se ha determinado entonces que este tratamiento con mezcla de solventes orgánicos a baja temperatura permite eliminar el 96-97% de la Hb y produce una preparación de ALA-D purificada 24 veces.

Segundo paso: Precipitación con sulfato de amonio: El sobrenadante dializado se fraccionó con sulfato de amonio, utilizándose la fracción 30-55% de saturación, disuelta en el mínimo volumen de buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 6,8. Esta fracción prácticamente no contenía Hb y se purificó cerca de 100 veces.

Tercer paso: Cromatografía por afinidad: Se aplicaron aproximadamente 80 mg de proteína de la fracción 30-55%, disuelta en 4 ml de buffer fosfato 0,05 M pH 6,8 en una columna de H₂N-ALA-S-AE-Sepharosa, previamente equilibrada con el mismo

buffer. La columna se corrió a 4 °C con un flujo de 0,4 ml/min primero con buffer sólo, y luego con buffer conteniendo KCl 0,05 M, 0,1 M y 0,2 M, como se indica.

TABLA I: Purificación del ALA-D de eritrocitos humanos

Fracción	Proteínas	Hb	Actividad Específica	Purificación
	(mg/ml)	%	($\frac{\text{nmoles PBG}}{\text{mg prot}}$)	
Glóbulos rojos	120,00 ⁰	100	1,4	1
<u>1° Paso:</u> Tratamiento con solventes orgánicos	28,80	3,70	34,1	24,3
<u>2° Paso:</u> Fracción 30-55% de (NH ₄) ₂ SO ₄	20,96	0,25	133,8	95,6
<u>3° Paso:</u> Afinidad cromatográfica	0,15	0,00	2.248,5	1.605,0

Las condiciones experimentales se describen en el texto.

Se recogieron fracciones de 2 ml. En la Figura 2 se muestra un perfil típico de elución. El ALA-D de eritrocitos humanos se purificó cerca de 18 veces en este único paso y un total de 1.600 veces en sólo 3 etapas.

El comportamiento cromatográfico del ALA-D de eritrocitos por columnas de afinidad fue muy similar al del ALA-D de *E. gracilis*, hígado bovino (Stella y Batlle, 1977, 1978) e hígado de cerdo (Poloycol, 1980).

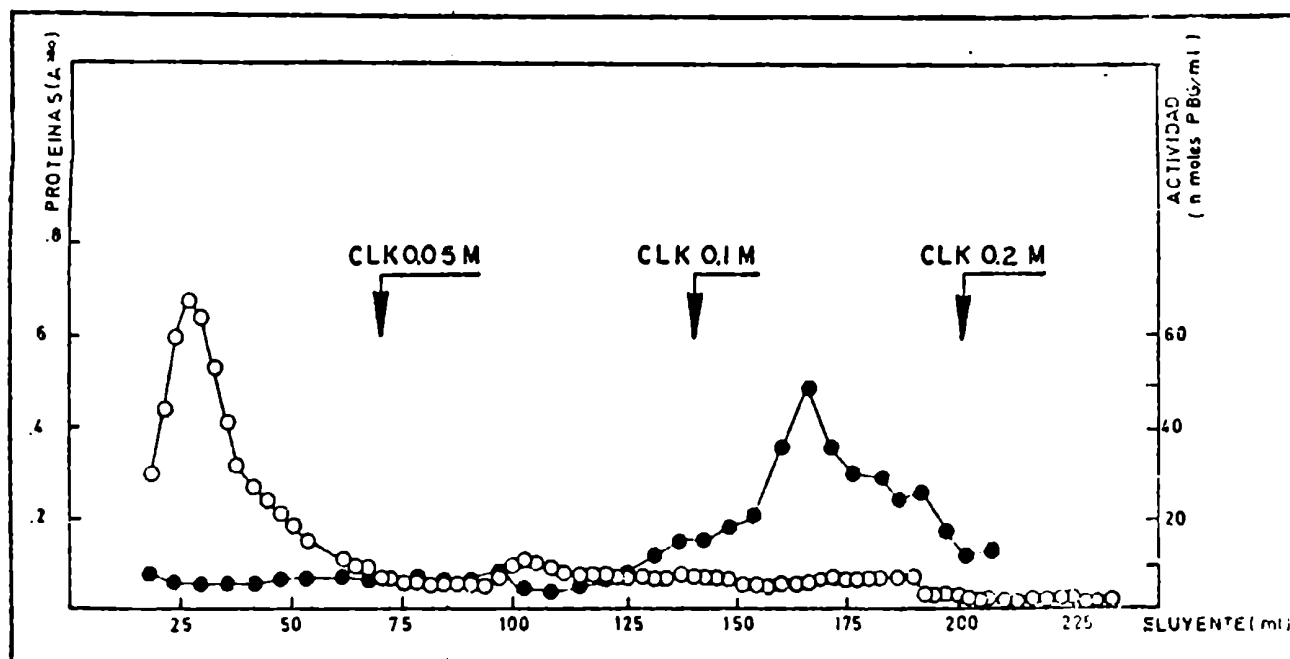


FIGURA 2: Cromatografía por afinidad del ALA-D de eritrocitos humanos sobre HOOC-ALA-S-AE-Sepharosa. La columna (1,4 x 15 cm) se equilibró con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 6,8. Se sembró la proteína y se eluyó primero con 75 ml de buffer fosfato, luego con 75 ml del mismo buffer conteniendo KCl 0,05 M (primera flecha), con 75 ml de buffer conteniendo KCl 0,1 M (segunda flecha) y finalmente, con 75 ml de buffer conteniendo KCl 0,2 M (tercera flecha). Proteína (○), actividad enzimática (●).

El peso molecular se determinó por cromatografía a través de Sepharosa 4-B, usando buffer fosfato de sodio 0,068 M conteniendo KCl 0,1 M, obteniéndose un único pico a 280.000 (Figura 3).

La teoría de la filtración por geles muestra que el parámetro que gobierna el volumen de elución no es el peso molecular de la proteína sino su radio de Stokes.

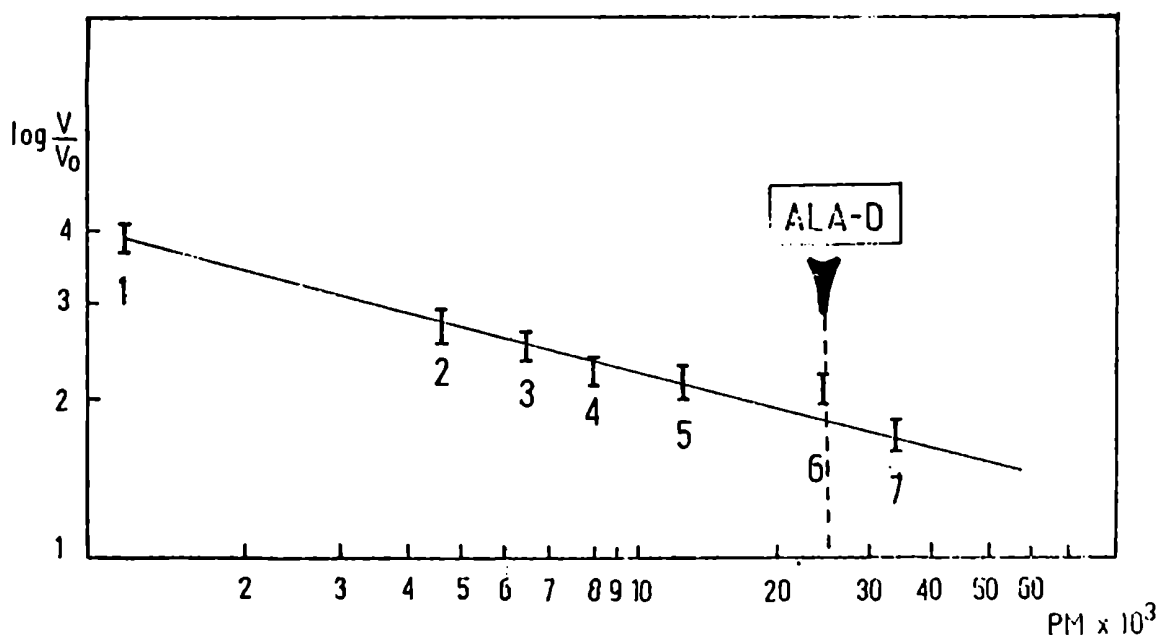


FIGURA 3: Curva de calibración para Sepharosa 4 B (2,4 x 40 cm).
 Testigos: 1: citocromo; 2: ovoalbúmina (monómero); 3: Seroalbúmina bovina (monómero); 4: ovoalbúmina (dímero); 5: seroalbúmina (dímero); 6: catalasa; 7: fibrinógeno.

I.3. PROPIEDADES

I.3.1. Efecto de la atmósfera y protectores de grupos sulfhidrilos

Como se sabe, el ALA-D es una enzima sulfhidrúlica, que necesita reactivos protectores de grupos sulfhidrilo para exhibir su máxima actividad. Disponiendo entonces de una preparación de ALA-D de eritrocitos humanos altamente purificada por este nuevo método, se estudió una vez más su comportamiento en presencia y ausencia de C₁SH, con y sin una preincubación de

15 minutos, y además, en aerobiosis y anaerobiosis.

En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos.

TABLA II: Estudio de las condiciones óptimas de incubación del ALA-D de eritrocitos humanos

	Aerobiosis				Anaerobiosis			
	Con CISH		Sin CISH		Con CISH		Sin CISH	
	Preinc.	S/preinc.	Preinc.	S/preinc.	Preinc.	S/preinc.	Preinc.	S/preinc.
Actividad específica (nmoles PBG/mg Prot)	89,4	88,0	2,1	1,8	83,1	63,9	3,9	6,7
Actividad (%)	100,0	98,5	2,4	2,1	92,9	71,5	4,3	7,5

Los detalles experimentales se describen en el texto. El resto de las condiciones de incubación fueron las standard.

Es interesante observar que la enzima exhibe la misma actividad en anaerobiosis y en aerobiosis, aunque tiene mayor actividad sin CISH en anaerobiosis que en aerobiosis; posiblemente en estas condiciones, los grupos -SH están mejor protegidos.

Empleando eritrocitos de ave (Batlle, 1968) se habían encontrado resultados similares.

Para ampliar el cuadro de posibles activadores, se ensayaron otros reductores de grupos -SH, a concentraciones variables.

En la Figura 4 se observa que tanto cisteína como glutatión y β -mercaptoetanol son buenos activadores. De los tres, el glutatión es el que produce máxima activación. El tioglicolato de Na, a iguales concentraciones, no tiene efecto.

De acuerdo con estos datos, se decidió incubar en aerobiosis, con CISH y sin preincubación.

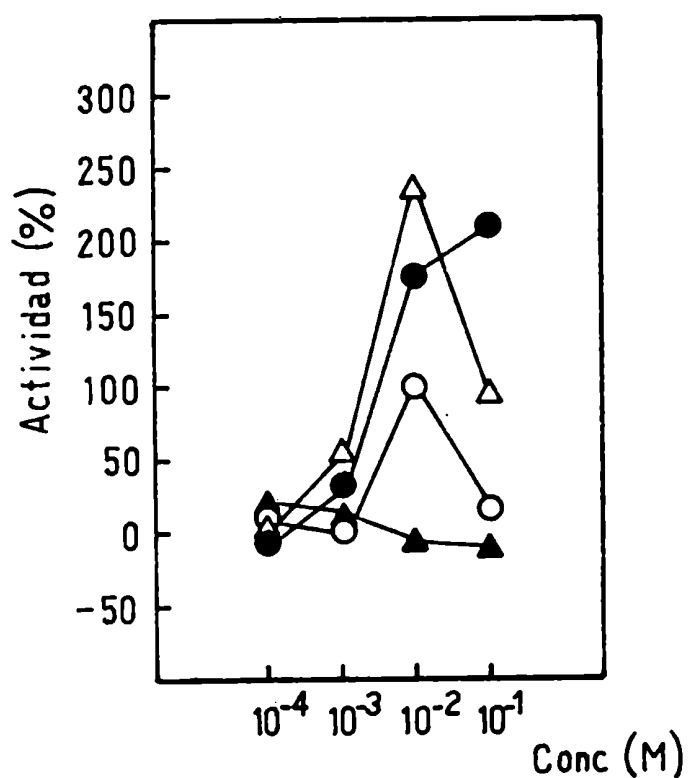


FIGURA 4: Efecto de algunos tioles sobre la actividad del ALA-D de eritrocitos humanos. CysH (○); β-mercaptoetanol (●); glutathión (△) y tioglicolato de Na (▲)

I.3.2. Efecto de inhibidores de grupos sulfhidrilos y su reversión por cisteína

Se estudió el efecto de distintos inhibidores de grupos sulfhidrilos, tales como p-cloromercuribenzoato, iodobenzoato, N-etilmaleimida y iodoacetamida, en concentración 1 mM final, y la reversión de su efecto por cisteína, en la misma concentración.

Como puede verse en la Tabla III, la actividad enzimática en presencia de cualquiera de los inhibidores usados está en el orden del 20-30%, siendo revertida por CiSH hasta un 90%.

TABLA III: Efecto de inhibidores de grupos sulfhidrilos y reversión por CiSH

Sistema	Actividad (%)
Control	100
+ PCMB	20
+ PCMB y CiSH	90
+ IB	28
+ IB y CiSH	80
+ NEMI	25
+ NEMI y CiSH	70
+ IA	24
+ IA y CiSH	68

Los inhibidores y la CiSH se utilizaron en concentración 1 mM final. Se usó la fracción 30-55% como fuente enzimática. El resto de las condiciones fueron las standard descriptas en Materiales y Métodos.

I.3.3. Curva de saturación por sustrato - Km

Se procedió a determinar la curva de saturación por sustrato, utilizando cantidades variables de ALA.

En la Figura 5 se ilustra la gráfica de las directas y la de las dobles recíprocas. Como puede verificarse, se ha trabajado siempre a saturación, ya que la concentración final de ALA ha sido de 2,5 mM y se puede calcular un Km de 7×10^{-4} , que es del orden del determinado por otros autores (Anderson y Desnick, 1979).

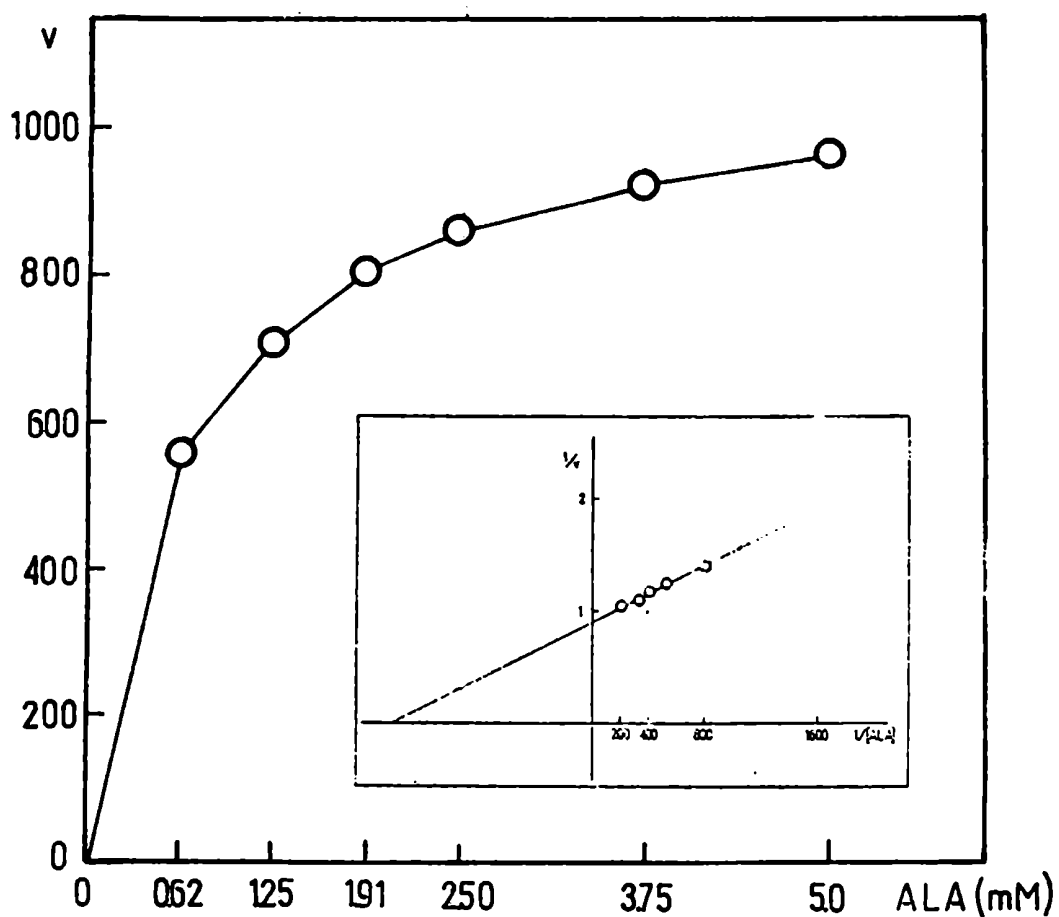


FIGURA 5: Curva de saturación por sustrato del ALA-D de eritrocitos humanos y de Lineweaver-Burk. La actividad específica de la enzima fue de 106,3 nmoles PBG/mg proteína.

I.3.4. pH óptimo

Para realizar la curva de pH se utilizaron buffers fosfato de sodio y TRIS-HCl 0,05 M. El pH óptimo se encuentra entre 6,8 y 7,0 para ambos buffers, como puede verse en la Figura 6.

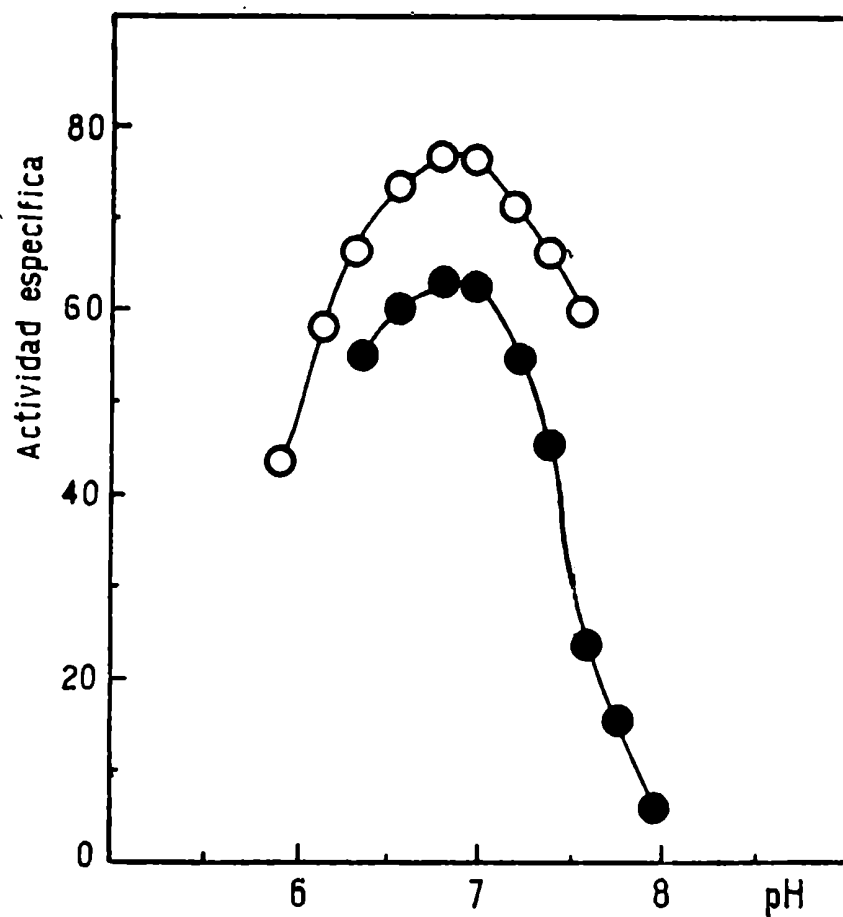


FIGURA 6: Curva de pH del ALA-D de eritrocitos humanos para buffer fosfato de Na 0,05 M (○) y TRIS-HCl 0,05 M (●)

I.3.5. Acción de cationes monovalentes

Se sabe que los cationes monovalentes actúan de formas diferentes, dependiendo del tejido en estudio. El K, Li, Na, Rb y NH₄ activan el ALA-D de algunas bacterias, mientras que el Na y el NH₄ tienen poca influencia sobre la actividad de esta enzima en vegetales (Stella, 1977).

El Na y el K estimulan ligeramente la actividad de la enzima proveniente de *E. gracilis*, siendo en cambio más notable el efecto del NH_4 (Stella, 1977). El Li la inactiva levemente.

En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos trabajando con ALA-D de eritrocitos humanos. A diferencia de la enzima de *E. gracilis*, ésta no se ve afectada por Na, Li y K, pero el ión NH_4 la activa significativamente, llegando a un 175% para una concentración de 0,6 mM.

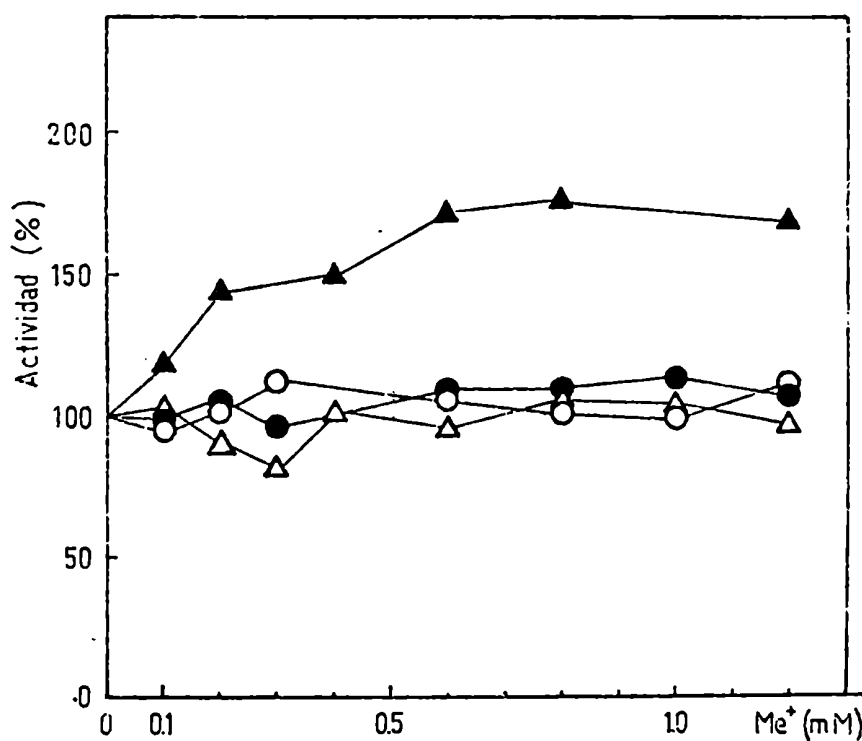


FIGURA 7: Efecto de diferentes cationes monovalentes sobre la actividad del ALA-D de eritrocitos humanos.
Na (○); K (●); Li (△) y NH_4 (▲).

I.3.6. Acción del Pb y los cationes divalentes Zn, Fe

I.3.6.1. Curva de saturación por Pb

En la Figura 8 se ilustran los resultados obtenidos incubando una preparación de ALA-D de eritrocitos humanos en presencia de concentraciones crecientes de acetato de Pb.

En todos los casos, los porcentajes de actividad con agregado de metales se expresarán considerando la del correspondiente control, sin agregados, como 100%.

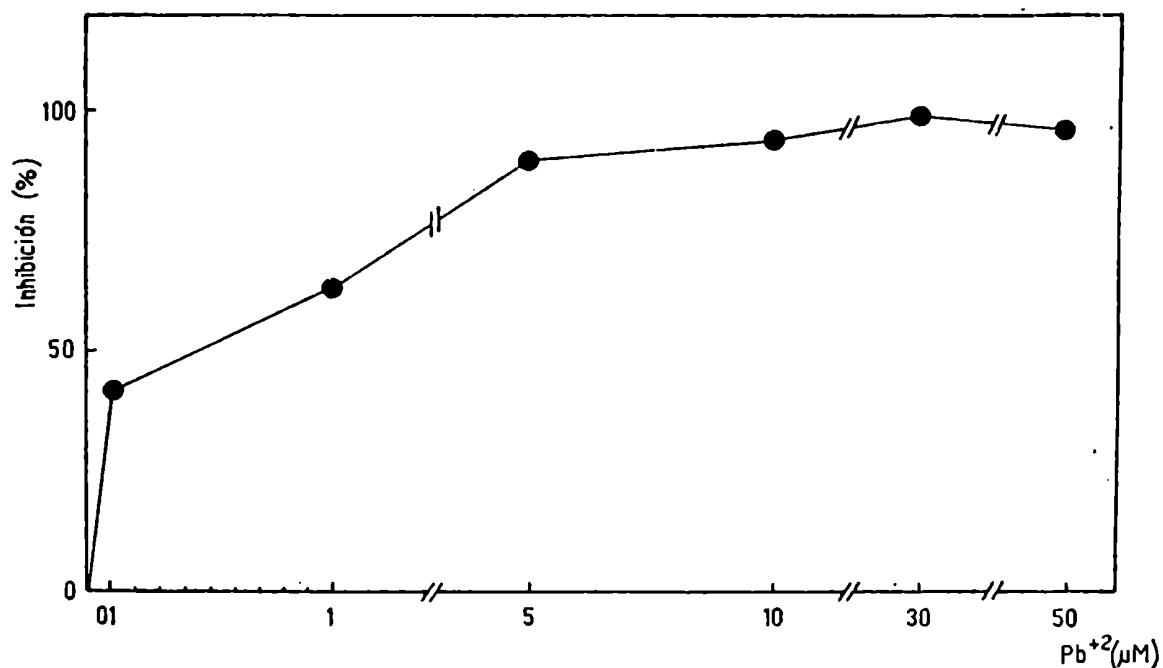


FIGURA 8: Efecto del Pb sobre la actividad del ALA-D de eritrocitos humanos.
La actividad específica del control fue de 61,3 nmoles PBG/mg prot.

La curva resultante muestra en forma clara que la enzima se inhibe rápidamente, aún a bajas concentraciones de Pb, alcanzando el 40% a 10^{-4} mM y el 90% a 5×10^{-3} mM de Pb. Comparando su comportamiento con el de la enzima de *E. gracilis* (Stella, 1977), la cual presenta un 40% de inhibición a una concentración final de 10^{-3} mM, vemos que la enzima de GR humanos es más sensible a la inhibición por este metal.

Se efectuó una experiencia similar sin agregado de C_2SH , observándose valores de actividad del orden del blanco sin sustrato.

I.3.6.2. Cinética de la inhibición por Pb

Para estudiar el tipo de inhibición que ejerce el Pb, se utilizaron 3 concentraciones del metal: 0,1; 1 y 10 mM, aunque a esta última la enzima se encuentra totalmente inactiva.

Las velocidades iniciales se obtuvieron utilizando concentraciones de ALA que variaron entre 0,31 y 2,5 mM final, a los tiempos 5, 10, 15, 30 y 60 minutos.

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos graficando las inversas de la velocidad inicial en función de las inversas de la concentración de sustrato. Puede verse que la inhibición por Pb es no competitiva, ya que afecta la pendiente y la ordenada al origen.

El K_m obtenido del gráfico es de 7×10^{-4} M.

Las constantes de inhibición (K_i) se encuentran entre 10^{-6} y 10^{-7} M, reafirmando la conocida y significativa afinidad de esta enzima por el Pb.

I.3.6.3. Efecto del plasma sobre la inhibición por Pb

Con el objeto de determinar si el plasma tiene algún efecto protector frente a la inhibición por Pb, se estudió la acción de este metal sobre la enzima purificada y la enzima cruda.

Se investigó además el efecto del plasma y del plasma desproteinizado sobre la actividad de la enzima purificada y el HC_3 , inactivados por Pb.

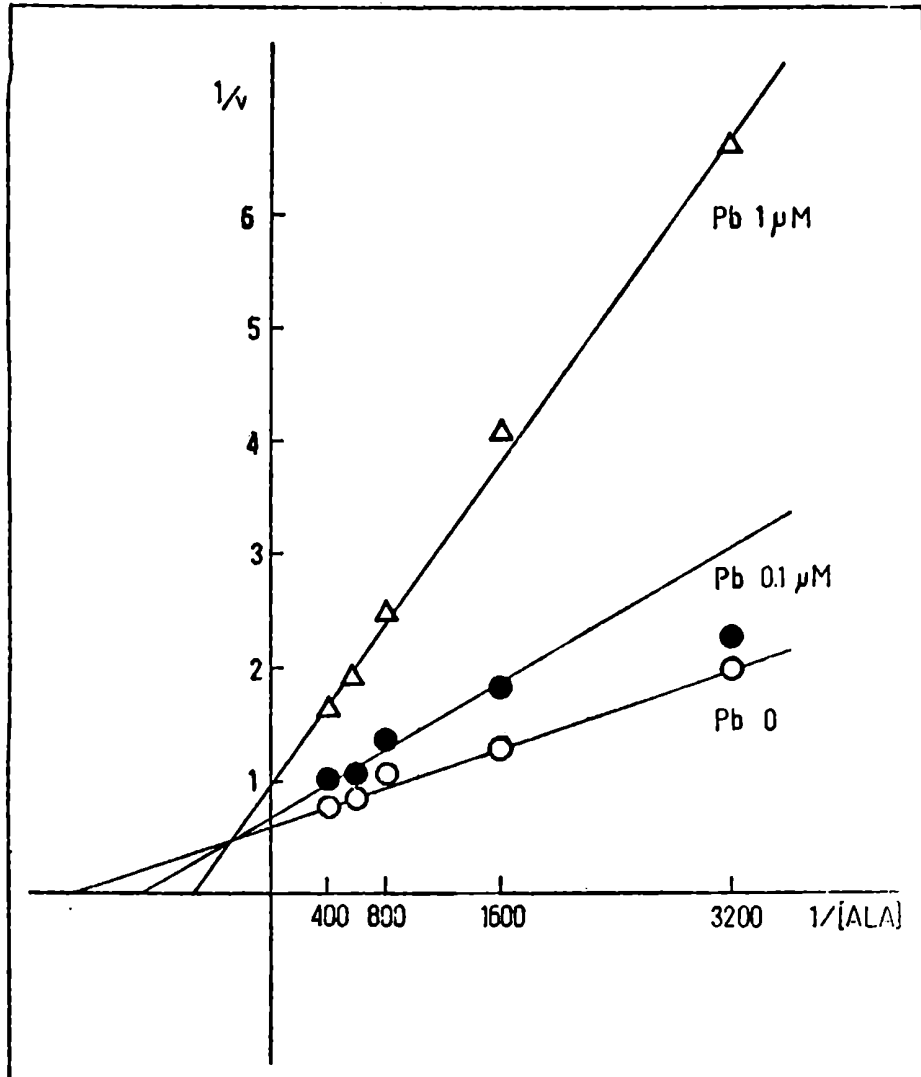


FIGURA 9: Tipo de inhibición por Pb del ALA-D de eritrocitos humanos. Control (\circ); Pb 0,1 μ M (\bullet) y Pb 1 μ M (Δ).

Como puede verse en la Figura 10, el plasma aparentemente protege en forma directa a la enzima purificada de la inactivación por Pb, pues para el caso del Pb 10^{-2} mM, disminuye su e

fecto del 66% al 13%.

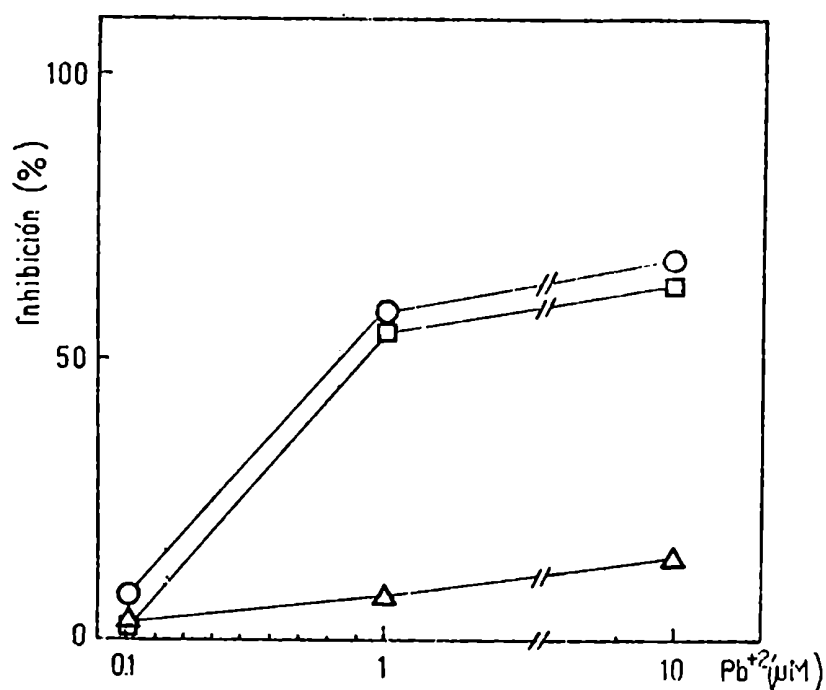


FIGURA 10: Efecto del plasma sobre la inhibición por Pb, empleándose como fuente de enzima ALA-D purificada 1.600 veces, según se describe en Materiales y Métodos. Control (sin agregados) (○); en presencia de plasma (△); en presencia de plasma desproteínizado (□).

En la Figura 11 podemos ver que para la misma concentración de Pb, pero empleando un sistema crudo, HC₃, el plasma también revierte el efecto inhibitorio del metal del 80% al 55%.

Surge asimismo de estas experiencias que en el plasma se encontraría un factor protector que sería de naturaleza proteica, ya que trabajando con plasma desproteínizado no hay rever-

si3n de la acci3n inhibitoria del plomo, por cuanto, dentro del error experimental, los resultados son iguales a los obtenidos en ausencia de plasma.

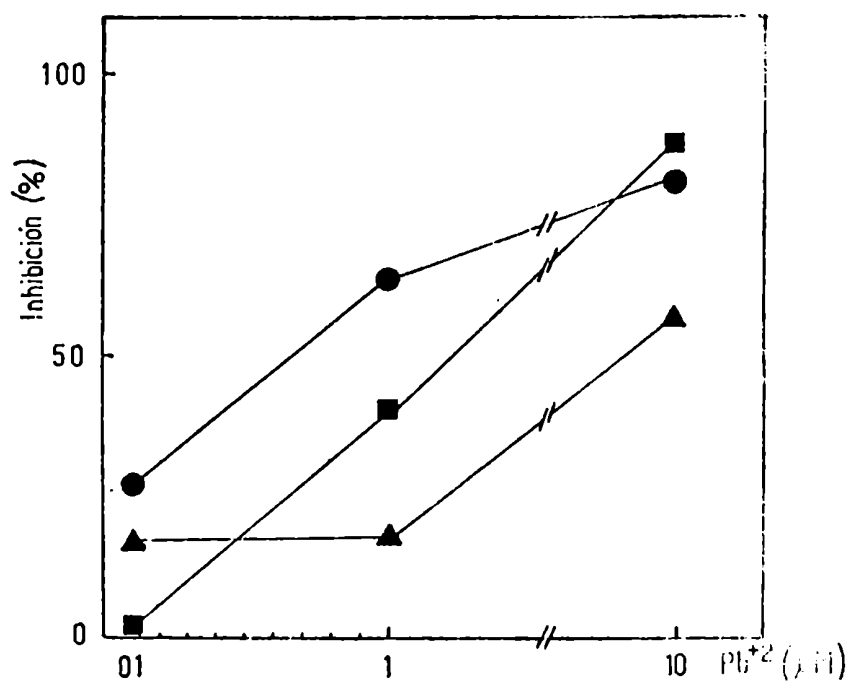


FIGURA 11: Efecto del plasma sobre la inhibición por Pb empleando como fuente de ALA-D el hemolizado HC_3 , obtenido según se describe en Materiales y Métodos. Control (sin agregados) (●); en presencia de plasma (▲); en presencia de plasma desproteínizado (■).

I.3.6.4. Curva de saturación por Zn

En la Figura 12 se ilustran los resultados obtenidos incubando una preparación de ALA-D de eritrocitos humanos con concentraciones de sulfato de zinc que varían entre 10^{-3} y 1 mM.

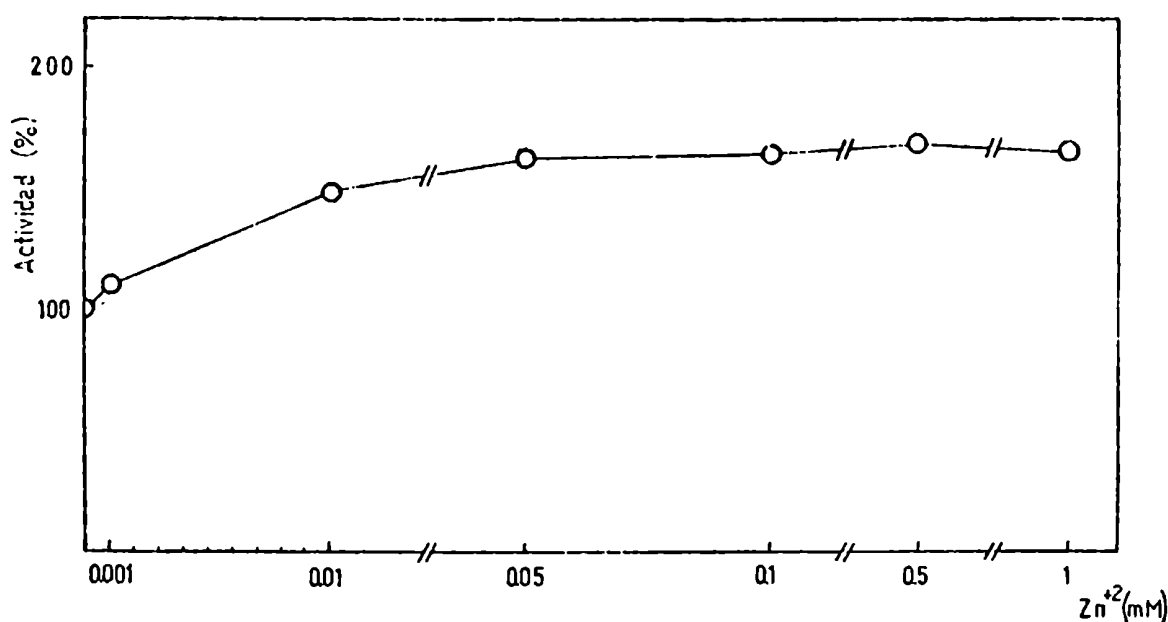


FIGURA 12: Efecto del Zn sobre la actividad del ALA-D de eritrocitos humanos. La actividad específica del control fue de 46,6 μ moles PBG/mg prot.

El Zn produce su efecto máximo cuando su concentración final es de 10^{-1} mM.

A diferencia del Pb, el efecto del Zn sobre la enzima de eritrocitos humanos no es similar al de la enzima de *E. gracilis*, ya que en este rango de concentraciones el Zn no modificaba la actividad *in vitro* (Stella, 1977).

Recordemos sin embargo que el ALA-D es una metaloenzima

en la cual el Zn posiblemente juegue un rol muy importante en la relación estructura cuaternaria-actividad *in vivo*.

I.3.6.5. Efecto combinado Pb-Zn

Con el objeto de investigar la propiedad del Zn de estimular la actividad del ALA-D en relación con su poder para revertir la acción inhibitoria del Pb *in vitro*, se ensayó el efecto de concentraciones variables de Zn a tres concentraciones distintas de Pb (Figura 13).

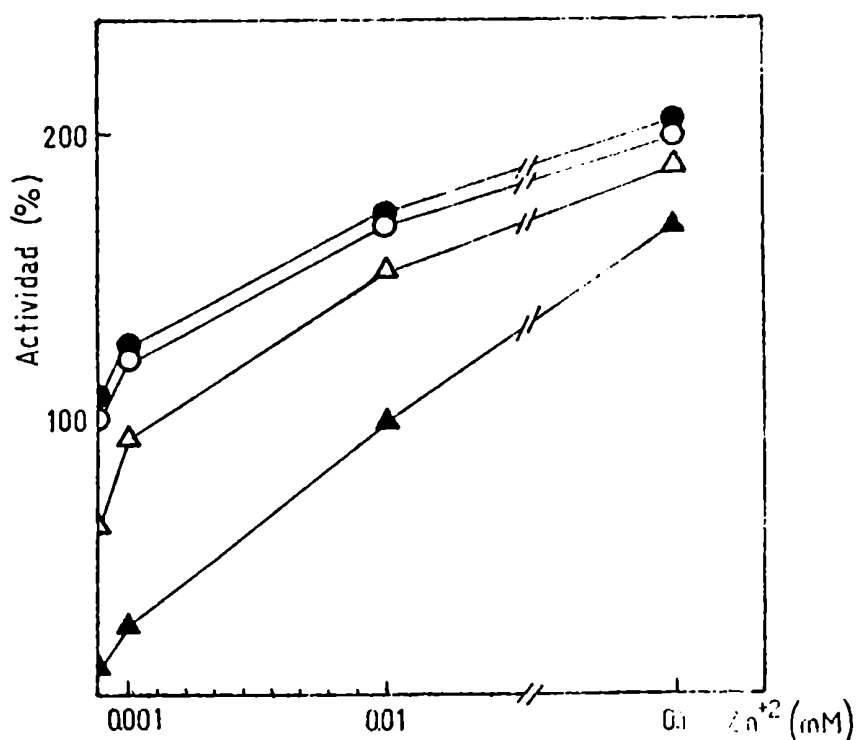


FIGURA 13: Efecto combinado de Pb y Zn sobre la actividad del ALA-D de eritrocitos humanos. Se utilizaron las siguientes concentraciones de Pb: control (sin Pb) (○); 0,1 μM (●); 1 μM (△) y 10 μM (▲). La actividad específica del control fue de 31,5 nmoles PBG/mg prot.

Se puede apreciar que el efecto activador del Zn es notable, ya que aún a concentraciones de 10^{-2} mM revierte totalmente la inhibición producida por una concentración de Pb de 10^{-2} mM, y la enzima tratada con una concentración de Pb de 10^{-4} mM llega a activarse hasta un 170%.

Cuando el Zn se encuentra presente en una concentración de 10^{-1} mM, produce un incremento de la actividad de un 160-300%, sobre cualquiera de los sistemas enzimáticos.

i.3.6.6. Curva de saturación por Fe

Teniendo en cuenta los datos obtenidos por otros autores (Anderson y Desnick, 1979) se estudió el efecto del Fe sobre el ALA-D purificada de eritrocitos humanos. Los resultados de esta experiencia (Figura 14) estuvieron de acuerdo con valores anteriores, observándose que el Fe inhibe la enzima un 20% a 10^{-1} mM.

Se realizó la misma experiencia en ausencia de CiSH, obteniéndose valores del orden del blanco sin sustrato.

I.3.6.7. Efecto combinado Pb-Fe

Aunque el efecto del Fe sobre la actividad del ALA-D de eritrocitos humanos es levemente inhibitorio, se sabe que puede revertir la inhibición producida por el Pb.

Como puede verse en la Figura 15, en presencia de una concentración de Pb 10^{-3} mM, que produce una inhibición del 40%, el agregado de Fe 1 mM revierte parcialmente esa inhibición, recuperándose hasta un 85% de la actividad control.

En el caso de tratarse una concentración de Pb de 10^{-2} mM, frente a la cual la actividad remanente es de sólo un 10%, el agregado de una concentración igual de Fe produce una recuperación de la actividad de hasta un 55%.

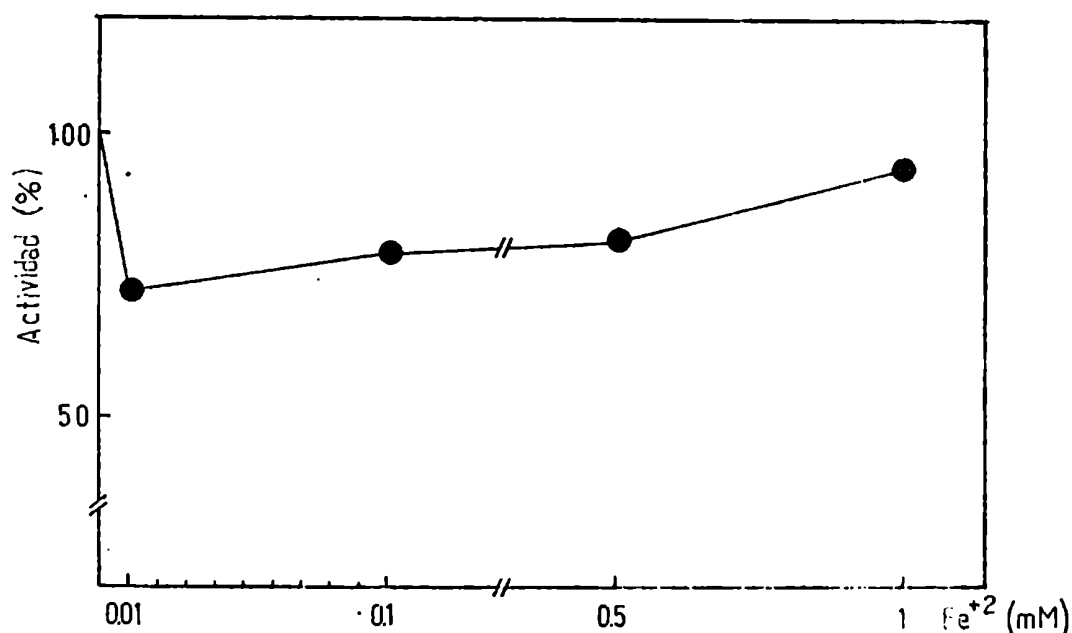


FIGURA 14: Efecto del Fe sobre la actividad del ALA-D de eritrocitos humanos. La actividad específica del control fue de 46,6 nmoles PBG/mg prot.

I.4: CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un nuevo método para la purificación del ALA-D, usando una mezcla de n-butanol y cloroformo, que desnaturaliza la hemoglobina, seguido de fraccionamiento por sulfato de amonio y afinidad cromatográfica.

En sólo tres etapas se obtiene una enzima purificada 1.600 veces.

El peso molecular de la enzima purificada fue de 280.000, coincidiendo con el determinado en otras fuentes.

Se comporta como una típica enzima sulfhidrónica, activándose en presencia de protectores de grupos sulfhidrilo e inhi-

biéndose frente a compuestos tales como PCMB, IB, NEMI y IA.

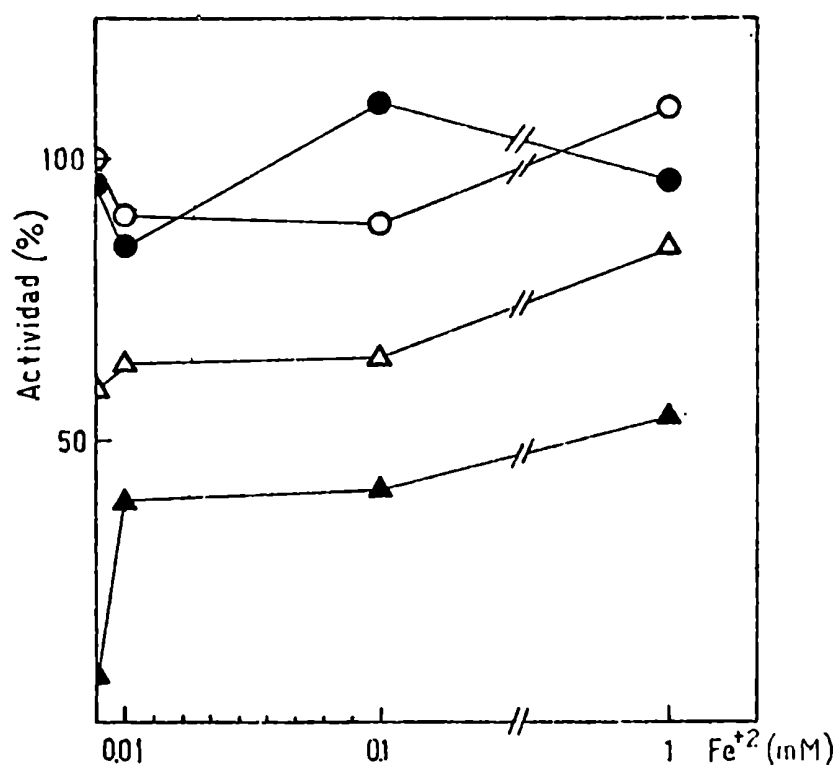


FIGURA 15: Efecto combinado de Pb y Fe sobre la actividad del ALA-D de eritrocitos humanos. Se utilizaron las siguientes concentraciones de Pb: Control (sin Pb) (○) 0,1 μM (●); 1 μM (△) y 10 μM (▲). La actividad específica del control fue de 31,5 nmoles PBG/mg Prot.

El pH óptimo se encuentra entre 6,8 y 7,0, y el K_m es de 7×10^{-4} M.

Los cationes monovalentes Na, Li y K no afectan la actividad del ALA-D de eritrocitos humanos, que en cambio se estimula significativamente por NH_4 .

Como era de esperar, el Pb, a concentraciones de 10^{-2} mM la inactiva prácticamente en forma total, respondiendo a una inhibición de tipo no competitivo.

El plasma protege en forma directa de la inactivación por Pb cuando se trabaja con enzima purificada o aún empleando un sistema crudo. El factor protector debe ser de naturaleza proteica ya que el plasma desproteinizado carece de efecto reactivante.

La acción inhibitoria del Pb se revierte totalmente en presencia de Zn; *in vitro* este metal estimula significativamente la actividad del ALA-D de eritrocitos humanos.

El Fe, que sólo inhibe un 20% la actividad de la enzima a una concentración 1 mM, posee sin embargo la capacidad de contrarrestar el efecto del Pb en grado significativo.

PARTE II

TERAPIA ENZIMATICA

DESARROLLO DEL TRANSPORTADOR

II.A.1. Derivados oxidados de Sephadex	198
II.A.1.1. Obtención de diferentes derivados	198
II.A.1.2. Ensayos de solubilización	198
II.A.1.3. Inmovilización del ALA-D	201
II.A.1.3.1. Sobre Sephadex oxidado	201
II.A.1.3.2. Sobre Sephadex etilendiamina	202
II.A.1.3.3. Solubilización del ALA-D unida al Sephadex oxidado	203
II.A.1.4. Inmovilización de Rodenasa	204
II.A.1.5. Inmovilización de Deaminasa	205
II.A.1.5.1. Sobre Sephadex oxidado	205
II.A.1.5.2. Sobre Sephadex etilendiamina	206
II.A.1.6. Conclusiones	208
II.A.2. Fantasmas de eritrocitos	209
II.A.2.1. Incorporación del ALA-D en los eri- trocitos. Cinética del proceso	209
II.A.2.2. Encapsulamiento del ALA-D en los fan- tasmas	210
II.A.2.3. Condiciones de resellado	211
II.A.2.4. Efecto de la concentración de enzima	214
II.A.2.5. Estabilidad del ALA-D encapsulada en eritrocitos <i>in vitro</i>	215
II.A.2.6. Niveles del ALA-D de eritrocitos sin tratar y fantasmas cargados con enzi- ma	217
II.A.2.7. Eficiencia de la incorporación. Par- tición del ALA-D entre las células y el espacio extracelular	218
II.A.2.7. Conclusiones	220

II. A. DESARROLLO DEL TRANSPORTADOR

II.A.1. DERIVADOS OXIDADOS DE SEPHADEX

II.A.1.1. Obtención de diferentes derivados

En base al hecho de que los liposomas pueden transportar enzimas hasta los lisosomas de las células del hígado y bazo, se ha propuesto que podrían emplearse como carriers en el tratamiento de ciertas deficiencias enzimáticas. También se han realizado estudios relacionados con la posible aplicación terapéutica de las enzimas inmovilizadas. Teniendo en cuenta el sitio en el cual debe actuar el ALA-D y la larga experiencia de nuestro grupo en el empleo de enzimas y ligandos inmovilizados para distintos fines, se decidió preparar un complejo enzima-soporte que fuera capaz de sufrir, bajo ciertas condiciones, una lenta solubilización, liberando así a la enzima activa unida a fragmentos del soporte.

Se sabe que la oxidación con periodato de polisacáridos como el Sephadex, produce polialdehídos con número variable de grupos aldehído. Estos derivados pueden solubilizarse lentamente en solución acuosa (Ham, 1967).

En consecuencia, por oxidación periódica de Sephadex, se preparó un soporte con una determinada velocidad de solubilización, que contenía además grupos activos apropiados para el acoplamiento con la proteína.

Se llevaron a cabo una serie de experiencias preliminares con el objeto de determinar las mejores condiciones de oxidación del Sephadex G-25, usando distintas concentraciones de NaIO_4 e intervalos variables de tiempo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 16. Se seleccionó entonces una concentración de NaIO_4 50 mM y 1 hora como las condiciones standard de oxidación.

II.A.1.2. Ensayos de solubilización

Se realizaron varias experiencias de solubilización del Sephadex oxidado en distintas condiciones y tiempos de solubili

zación, de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos.

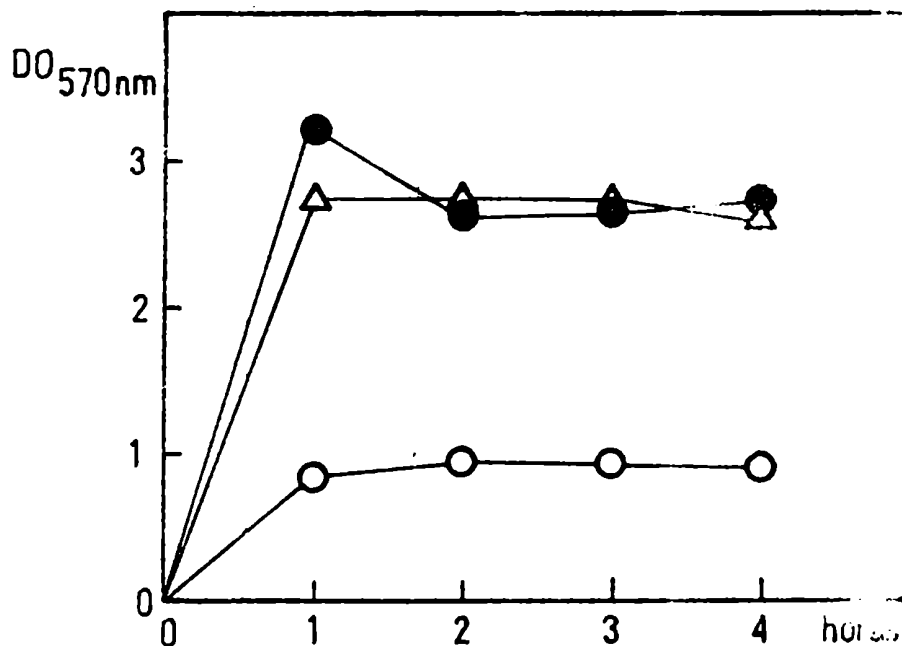


FIGURA 16: Efecto de la concentración de NaIO_4 y el tiempo de la reacción sobre la oxidación del Sephadex G-25. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos. Se utilizaron las siguientes concentraciones de NaIO_4 : 20 mM (○), 50 mM (●) y 100 mM (△).

Los resultados obtenidos cuando la solubilización se realizó en tubos de ensayo se muestran en la Figura 17.

Si bien la diferencia de peso no fue significativa, analizando la absorbancia a 240 nm se observa que la solubilización es ligeramente superior a pH 7,4 que a pH 8,0, y además, entre 2 y 3 veces mayor cuando se oxidó con IO_4^- 0,2 M en relación a IO_4^- 0,1 M.

La solubilización alcanza un máximo del 6-7% en 48 horas,

lo cual no satisface nuestros requerimientos.

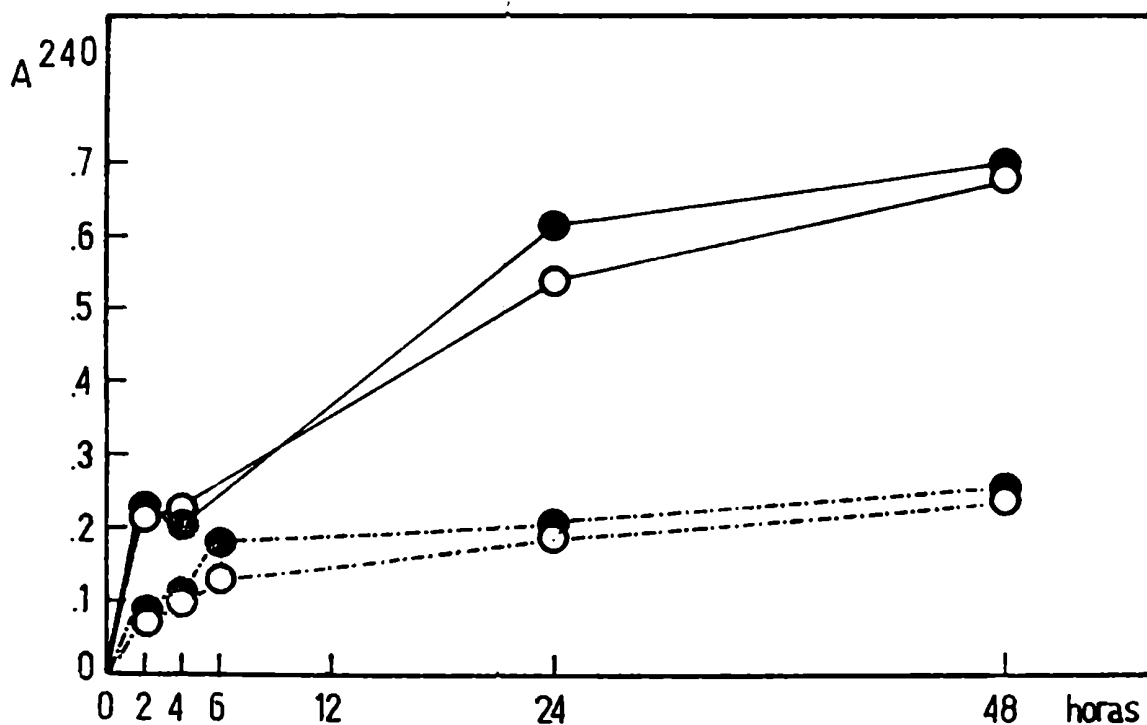


FIGURA 17: Solubilización del Sephadex-Polialdehído en tubos de ensayo, determinada en base a la concentración de grupos carbonilo (A_{280}) en función del tiempo de solubilización, a pH 8,0 (○) y 7,4 (●), oxidando con NaIO_4 0,1 M (---) y 0,2 M (—).

Cuando la solubilización se realizó en erlenmeyers, se obtuvieron los resultados que se ilustran en la Figura 18.

El porcentaje de solubilización es mayor que en el caso anterior, pero de todas formas, aún no es suficiente. También en este caso la solubilización fue 2 y 3 veces mayor cuando la oxidación se realizó con IO_4^- 0,2 M que con IO_4^- 0,1 M.

Se ensayó además la oxidación de Sepharosa 4B con IO_4^- 0,2 M y su solubilización a pH 7,4 en erlenmeyers, obteniéndose

los mismos resultados que para el Sephadex G-25.

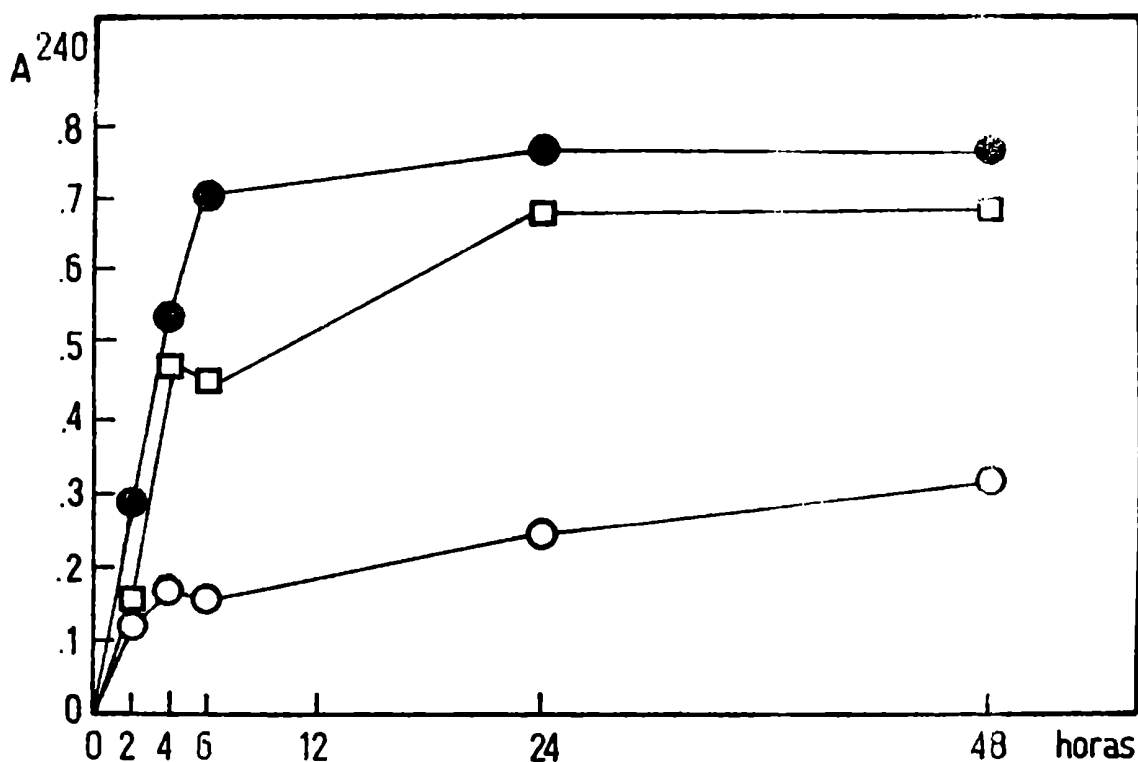


FIGURA 18: Solubilización del Sephadex-Polialdehído en erlenmeyers. Porcentaje de solubilización en base al peso (□) y en base a la concentración de grupos carbonilo (A₂₄₀) en función del tiempo de solubilización, a pH 7,4, oxidando con NaIO₄ 0,1 M (○) y 0,2 M (●).

II.A.1.3. Inmovilización del ALA-D

II.A.1.3.1. Sobre Sephadex oxidado

Debemos recordar aquí que el grupo ε-amino de un residuo lisina, ubicado en el sitio activo del ALA-D, forma una base de

Schiff con el grupo carbonilo de su sustrato, el ALA. Sabíamos que en la unión de este soporte a la enzima se encontrarían involucrados algunos grupos ϵ -amino; sin embargo, estudios previos (Stella y col, 1977) habían demostrado que por lo menos el 50% de los grupos ϵ -amino esenciales del ALA-D bovina parecerían encontrarse bastante protegidos cuando se preparaba el complejo Sepharosa-enzima. Si bien la naturaleza de los restos involucrados en esta reacción de acople no era exactamente la misma, se procedió de todas maneras a determinar las condiciones óptimas de acoplamiento.

Usando una cantidad fija de proteínas y diferentes tiempos o cantidades variables de enzima a un tiempo constante, a 2 temperaturas, se encontró que, en todos los casos, el ALA-D inmovilizada resultante era inactiva. En consecuencia, se intentó proteger los grupos ϵ -amino del sitio activo tratando la enzima con ALA, antes o durante la inmovilización. Tampoco en estas condiciones se logró el objetivo, ya que la enzima inmovilizada fue siempre totalmente inactiva.

En conclusión, es altamente probable que en esta reacción de acoplamiento entre restos aldehído del soporte y grupos ϵ -amino de la proteína, todos los restos ϵ -amino del sitio activo reaccionen preferencialmente con los grupos aldehído del carrier, produciendo así una enzima insolubilizada inactiva.

II.A.1.3.2. Sobre Sephadex-etilendiamina

Al Sephadex-etilendiamina se le acopló la enzima mediante el agregado de carbodiimida soluble, según se describe en Materiales y Métodos, obteniéndose así otro derivado insolubilizado del ALA-D, en el cual la proteína estaba unida al soporte a través de un brazo. Como se puede apreciar de los resultados obtenidos (Tabla IV), el 15% de las proteínas agregadas se unió a la matriz, resultando un complejo gel-enzima con sólo un 20% de actividad con respecto al valor de partida, de manera que el producto logrado aún no satisfacía nuestros requerimientos.

TABLA IV: Inmovilización de ALA-D sobre Sephadex-etilendiamina

Proteína			Unidades enzimáticas			Actividad específica		
Sembradas	Recuperadas	%	Sembradas	Recuperadas	%	Sembradas	Recuperadas	%
80,95	11,94	14,8	6.163	336,6	5,5	300	50	20

La metodología empleada se describe en Material y Métodos.

II.A.1.3.3. Solubilización del ALA-D unido al Sephadex oxidado

Aunque el ALA-D acoplada directamente al Sephadex oxidado era inactiva, se llevaron a cabo una serie de experiencias con el objeto de determinar si tenía lugar alguna liberación de la enzima unida a fragmentos del soporte, a partir del complejo Sephadex-ALA-D, suspendiendo el gel-enzima en un volumen igual de buffer fosfato 0,05 M pH 6,8. La mezcla se agitó muy suavemente a 2 temperaturas diferentes: 4 °C y 37 °C. Se tomaron muestras de 1 ml a distintos intervalos, se centrifugaron y se ensayó la actividad enzimática en el sobrenadante y en el gel resuspendido en un volumen igual al original con buffer; además, se midieron proteínas en el sobrenadante.

La Figura 19 muestra sólo los datos de proteínas en el sobrenadante ya que, como se esperaba, la actividad fue nula tanto en el gel como en el sobrenadante, en todos los casos.

Estos resultados están indicando que de la enzima insolubilizada se libera proteína, aunque inactiva, y que su solubilización depende de la temperatura y del tiempo. También fue evidente que un aumento en el pH y la fuerza iónica aceleran la velocidad de solubilización.

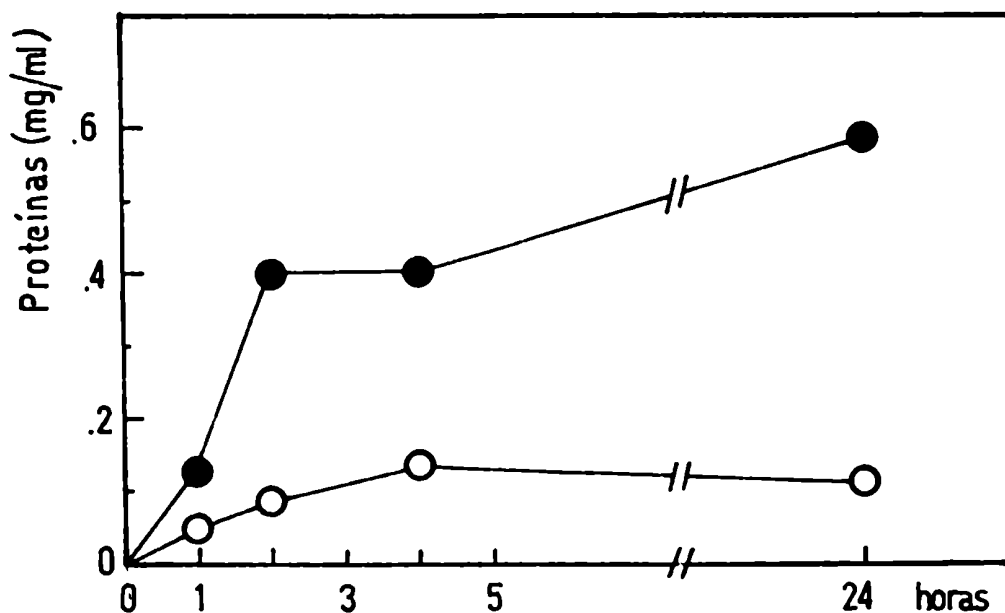


FIGURA 19: Velocidad de liberación de la proteína enzimática a partir del ALA-D inmovilizada suspendida en buffer fosfato de Na 0,05 M pH 6,8. Las condiciones experimentales se describen en el texto. Contenido de proteínas en el sobrenadante a diferentes intervalos, a 4 °C (○) y a 37 °C (●).

II.A.1.4. Inmovilización de Rodenasa

Para determinar si el procedimiento de inmovilización sobre Sephadex-oxidado podría de todas maneras ser útil para los fines propuestos, se decidió estudiar comparativamente el comportamiento del ALA-D con el de otra enzima que poseyera, en principio, grupos ϵ -amino no esenciales, como por ejemplo la Rodenasa. Se inmovilizaron paralelamente ambas enzimas: ALA-D y Rodenasa, y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V.

TABLA V: Acoplamiento de la Rodenasa y ALA-D al derivado polialdehídico de Sephadex G-25

Fracción	Rodenasa		ALA-D	
	Unidades	Proteína total (mg)	Unidades	Proteína total (mg)
Enzima soluble	36,7	17,0	18,83	58,8
Gel-enzima	1,8	4,1	0,00	4,5
Sobrenadante	19,0	12,5	1,17	47,4
Lavados	0,6	1,4	0,23	5,8

La metodología empleada se describe en Materiales y Métodos

Podemos observar que para ambas enzimas el rendimiento de acople fue bajo, recuperándose la mayor parte de la proteína en el sobrenadante (75-80%); sólo el 25% de la Rodenasa y el 7% del ALA-D se unió al carrier. Esto está indicando que tanto las condiciones de oxidación del soporte, como las de acoplamiento enzima-soporte, no fueron las óptimas y por lo tanto debe re-examinarse el efecto de las distintas variables involucradas en ambos procesos. Es probable que aumentando el grado de oxidación del soporte, se incremente la cantidad de proteína acoplada. De todas maneras, es interesante observar que la preparación de Rodenasa insolubilizada, resultó catalíticamente activa.

II.A.1.5. Inmovilización de Deaminasa

II.A.1.5.1. Sobre Sephadex oxidado

La inmovilización de una preparación de Deaminasa sobre Sephadex oxidado resultó infructuosa ya que, como podemos observar en la Tabla VI, la enzima no se unió al soporte, recuperándose prácticamente el 100% de la proteína agregada en el sobrena-

dante. En consecuencia, es lógico que el gel no tuviera actividad enzimática.

TABLA VI: Inmovilización de la Deaminasa sobre Sephadex-polialdehído

Unidades enzimáticas		%
Sembradas	20,43	100
Recuperadas	11,17	54,7

La metodología empleada se describe en Materiales y Métodos

Se aprecia además que el tratamiento inactivó la enzima, dado que en el sobrenadante sólo se recuperó el 55% de las unidades iniciales.

Los resultados son en cierto modo similares a los obtenidos con ALA-D, lo cual era de esperar si recordamos que en la Deaminasa también hay grupos amino involucrados en el sitio activo.

II.A.1.5.2. Sobre Sephadex-Etilendiamina

Los resultados obtenidos cuando se intentó acoplar la Deaminasa a Sephadex-etilendiamina se muestran en la Tabla VII.

Se observa que, a pesar de que el gel no tuvo actividad enzimática, el 40% de la proteína agregada se unió al gel.

Suponiendo que la inactivación podía deberse al pH y al prolongado tiempo de acople, y teniendo en cuenta que la reacción de unión gel-enzima también puede ocurrir a pH 6 (Affinity Chromatography, 1979) se decidió repetir la experiencia a este

último pH, durante un tiempo menor, de 3 horas.

TABLA VII: Inmovilización de la Deaminasa sobre Sephadex-etilendiamina

	Proteína			Unidades enzimáticas			Actividad específica		
	Sembrada	Recuperada	%	Sembradas	Recuperadas	%	Sembrada	Recuperada	%
a	20,60	12,29	40,3	23,495	0,0405	0,17	4,563	0,0144	0,31
b	19,02	13,13	31,0	8,794	0,5880	6,69	2,081	0,4540	21,80

a: Experiencia realizada a pH 5, permitiendo un contacto de 5 horas.

b: Experiencia realizada a pH 6, permitiendo un contacto de 3 horas.

Puede observarse que tampoco en este caso el gel presentó actividad enzimática, a pesar de que se unió el 31% de la proteína, mientras que en el sobrenadante se recuperó el 20% de la actividad.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se realizó una experiencia con el objeto de determinar si la carbodiimida, o la combinación de carbodiimida y pH bajo, inhibían a la Deaminasa.

En la Tabla VIII se muestran los resultados obtenidos. Puede observarse que la carbodiimida por sí sola a pH 7 inhibe a la enzima un 50%, mientras que a pH 4,7 la inhibición es total.

TABLA VIII: Efectos de la carbodiimida y el pH sobre la Deaminasa

	Unidades enzimáticas (nmporf/ml enz)	Proteínas	Actividad específica	%
Control	10,61	3,36	3,156	100,00
Enzima + Carbodiimida				
pH 7	1,01	0,69	1,453	46,00
pH 4,7	0,03	0,37	0,015	0,50
pH 5	0,97	3,72	0,263	8,33

Se agregó carbodiimida (100 mg) a 2 ml de enzima. Se ajustaron los pH de las mezclas resultantes. Todos los sistemas se mantuvieron 5 horas en hielo. Las fracciones conteniendo carbodiimida se pasaron por una columna de Sephadex G-25, previa medición de su actividad. El resto de las condiciones experimentales fueron las descritas en Materiales y Métodos.

II.A.1.6. Conclusiones

Del resultado de esta serie de experiencias se ha observado, por una parte, que el grado de solubilización de los distintos derivados de Sephadex oxidado es bajo; además, que el rendimiento de acople de cualquiera de las enzimas ensayadas desde el punto de vista de la proteína unida también ha sido pobre, y sólo en el caso de Rodenasa, el gel-enzima producido tiene cierta pero insuficiente actividad, mientras que las preparaciones paralelas de ALA-D o Deaminasa resultaron completamente inactivas.

En consecuencia, es evidente que este tipo de transportador no cumple con ninguno de los requisitos necesarios para nuestros fines, por lo cual fue preciso iniciar la búsqueda de otro carrier.

II.A.2. FANTASMAS DE ERITROCITOS

Señalamos ya, que entre los posibles sistemas transportadores de enzimas, eventualmente útiles para su aplicación en la terapia enzimática, se encontraban ciertos derivados de enzimas insolubilizadas y otros constituidos por células artificiales o naturales. En la segunda categoría de este último grupo se ubican células verdaderas, como son los eritrocitos y recientemente se ha propuesto precisamente el uso de enzimas atrapadas en eritrocitos, como una forma eficaz de introducir enzimas exógenas total y funcionalmente activas, en tejidos y órganos vitales, como medio para compensar o subsanar una deficiencia congénita o adquirida.

Se investigó entonces la posibilidad de usar los fantasmas de eritrocitos como transportadores del ALA-D.

II.A.2.1. Incorporación del ALA-D en los eritrocitos. Cinética del proceso

Se estudiaron las condiciones óptimas de encapsulamiento del ALA-D en los eritrocitos. Está demostrado que compuestos de alto peso molecular pueden entrar en los eritrocitos durante la hemólisis (Ihler y col, 1973). Bajo estas condiciones hipotónicas, la célula se hincha y se forman agujeros en la membrana, permitiendo el equilibrio entre las soluciones intra y extracelular. Luego de la hemólisis los poros se cierran y la membrana nuevamente es competente para excluir las macromoléculas.

La incorporación de ALA-D por los eritrocitos en función del tiempo (Figura 20) muestra que la entrada de enzima extracelular y la salida de Hb proceden paralelamente. El máximo de incorporación de ALA-D ocurre dentro de los primeros 5 minutos de la dilución, luego la cantidad de enzima que puede incorporarse disminuye; en forma paralela se libera el 60-70% de la Hb intracelular dentro del mismo período de 5 minutos.

Se ha encontrado que el rendimiento de incorporación de ALA-D no varía significativamente cuando la temperatura de hemólisis es 0, 4 y 20 °C, aunque es cerca de un 15% mayor a bajas temperaturas que a 20 °C. En un rango de pH de 6,8 a 7,4 la cantidad de enzima incorporada es similar.

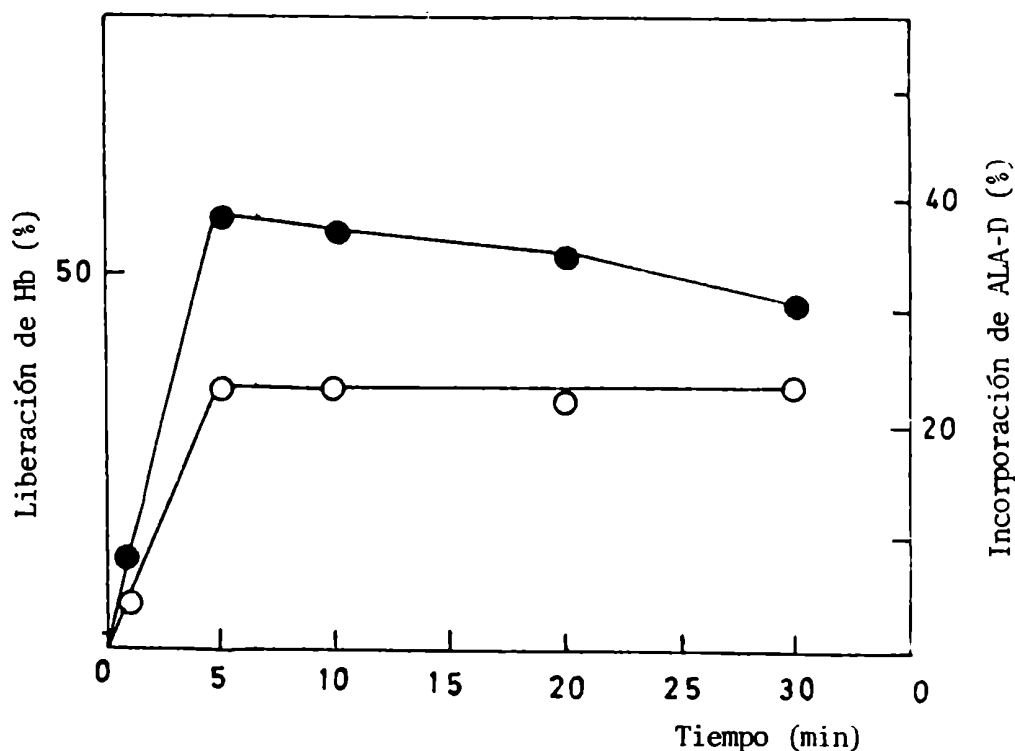


FIGURA 20: Cinética del proceso de incorporación del ALA-D en los eritrocitos. Los fantasmas de GR humanos se prepararon como se describe en Materiales y Métodos. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados durante la lisis y luego se resellaron las células. Se determinó la liberación de Hb (○) y la entrada de ALA-D (●) luego del lavado de los eritrocitos resellados.

II.A.2.2. Encapsulamiento del ALA-D en los fantasmas

Varias experiencias control, han indicado que la enzima se incorpora dentro del eritrocito y que no está adsorbida a las membranas. Se sometió a los eritrocitos de individuos normales e intoxicados con Pb al mismo tratamiento ya descrito para la preparación de fantasmas, excepto que se mantuvieron las con

diciones isotónicas durante todo el proceso. En estos ensayos, los eritrocitos sujetos a este tratamiento en ausencia de enzima presentaban una actividad de ALA-D de 497,0 U/ml y de 462,7 U/ml luego de la exposición a la solución conteniendo ALA-D. Esto demuestra que la enzima no está adsorbida a las membranas. Además, el contenido de Hb en ambos tipos de células fue el mismo, es decir no se observó liberación de Hb, indicando que el manipuleo de las células durante el procedimiento es muy suave.

Además, por sucesivos lavados y centrifugaciones de los eritrocitos cargados, no se detectó liberación de la enzima; asimismo la lisis de células cargadas, por sonicación (10 seg), congelamiento y descongelamiento y/o tratamiento con Tritón, liberó el ALA-D en forma soluble. Por lo tanto, resulta muy improbable que la proteína se encuentre adsorbida o asociada a la membrana.

Para obtener una confirmación adicional, se lisaron fantasmas cargados y vaciados por congelamiento y descongelamiento, se centrifugaron y la fracción soluble se cromatografió por Sepharosa 4B. Como control, por la misma columna se corrió una fracción de la enzima altamente purificada con la que se cargaron los fantasmas. En la Figura 21 podemos ver que los picos de las tres preparaciones coinciden, demostrando una vez más que la enzima se incorpora al eritrocito, no queda adsorbida a las membranas, y que la enzima incorporada y la endógena se comportan de igual forma.

II.A.2.3. Condiciones de resellado

Se examinaron también los efectos del tiempo y temperatura de resellado (Figura 22). Las muestras se lisaron durante 5 minutos a 4 °C y se resellaron durante distintos tiempos a 4 y 37 °C. La muestra se tomó al tiempo indicado y se lavó con buffer fosfato salino a 4 °C. Se encontró que después de 5 minutos la incorporación es independiente del tiempo de resellado y cabe señalar que un simple lavado con solución salina inmediatamente después de la lisis da por resultado un resellado casi completo de las células, ya que la incorporación del ALA-D es sólo ligeramente menor a tiempo 0.

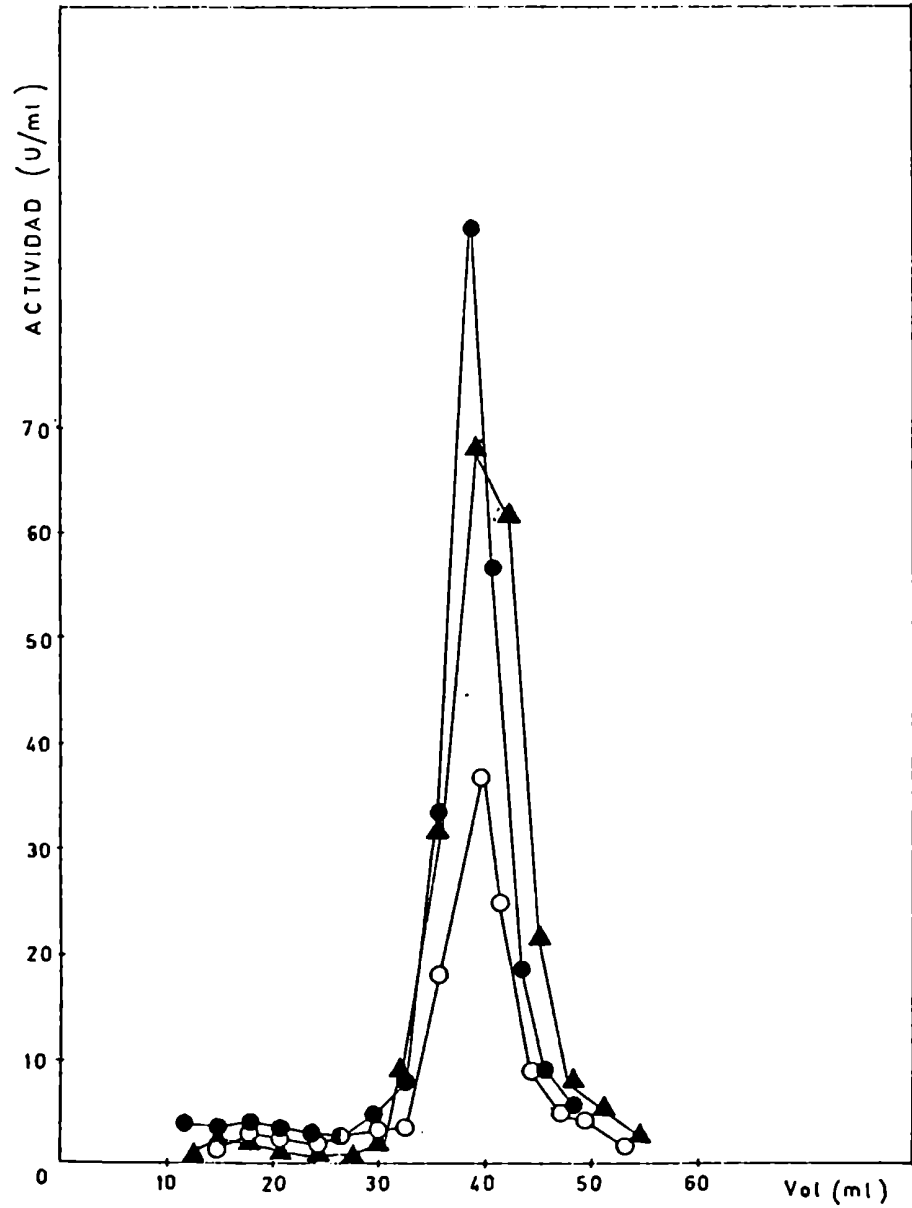


FIGURA 21: Cromatografía por Sepharosa 4B de la fracción soluble de fantasmas cargados y vaciados. La columna de Sepharosa 4B (50 ml de volumen) se eluyó con buffer fosfato 0,05 M pH 6,8. Fantasmas vaciados (○); fantasmas cargados (●); enzima purificada (▲).

El encapsulamiento de la enzima no se ve muy afectado cuando la temperatura de resellado es de 4 ó 37 °C, aunque es algo mayor a 37 °C que a bajas temperaturas, de todas maneras por razones prácticas el resellado se lleva a cabo a 4 °C.

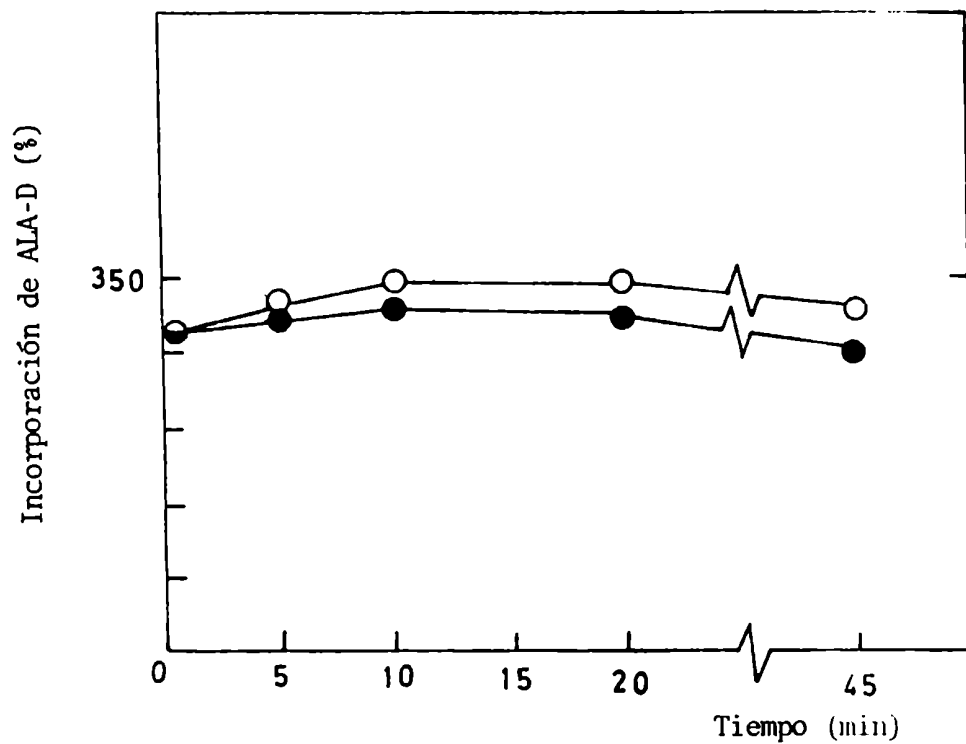


FIGURA 22: Tiempo y temperatura de resellado. El ALA-D se incorporó a los fantasmas de GR humanos como se describe en Materiales y Métodos. El resellado se llevó a cabo contra buffer fosfato salino a 37 °C (○) y 4 °C (●). En los puntos indicados, las muestras se lavaron con buffer fosfato salino y se centrifugaron.

II.A.2.4. Efecto de la concentración de enzima

Se encontró que la cantidad de enzima atrapada por los eritrocitos dependía de la concentración de enzima en la solución hipotónica de relleno (Figura 23). De esta manera, la concentración final de ALA-D en las células puede hacerse bastante alta ya que en el momento del relleno las concentraciones intra y extracelular deben encontrarse aproximadamente equilibradas.

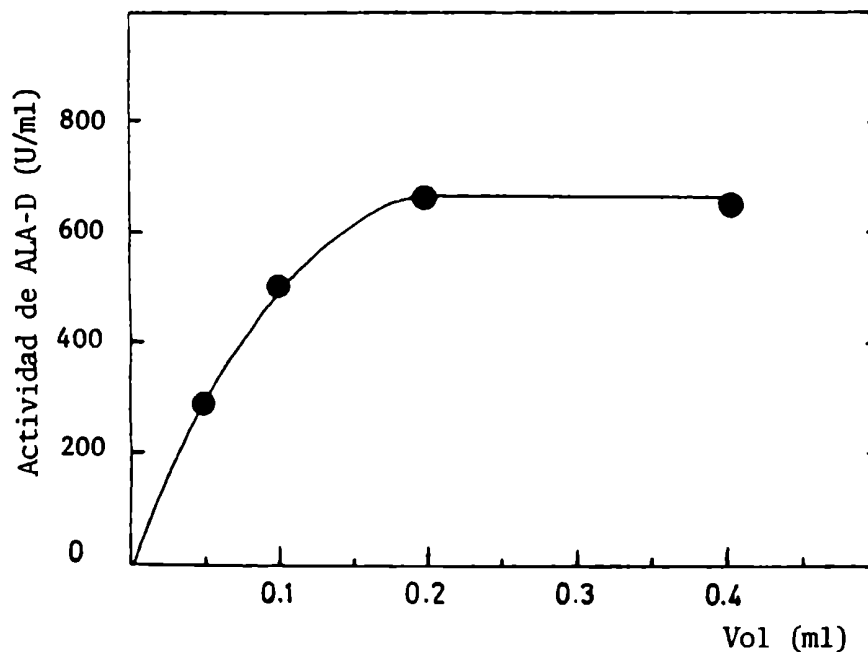


FIGURA 23: Velocidad de incorporación de las proteínas en los fantasmas de GR humanos. Los GR fueron cargados con concentraciones variables de ALA-D humana purificada, como se describe en Materiales y Métodos.

Una consideración importante si se desea que la terapia por reemplazo enzimático sea exitosa es la incorporación de sufi

ciente enzima activa dentro de los fantasmas. Como la cantidad de proteína atrapada en los eritrocitos aumenta cuando aumenta la concentración de proteína en el medio de hemólisis, para un máximo de efectividad debemos usar tanta proteína como sea posible, además de una preparación de ALA-D del mayor grado de purificación. Se obtuvo entonces un ALA-D purificada 1.600-1.700 veces, muy estable, a partir de sangre de diferentes fuentes. Se observó que la actividad inicial del ALA-D de sangre de rata era 4-5 veces menor que la de humanos, conejos y ratones, produciendo en consecuencia una fracción de ALA-D purificada, 4-5 veces menos activa.

Por otro lado, el volumen disponible de sangre de ratones y conejos es mucho menor que el humano. De estas consideraciones y teniendo en cuenta que en última instancia nuestro objetivo es aplicar la terapia por reemplazo enzimático en casos humanos, se concluye que, pudiéndose obtener cantidades prácticamente ilimitadas de ALA-D muy activa y estable de sangre humana, se ha seleccionado a ésta como fuente de ALA-D exógena para las experiencias de terapia enzimática.

II.A.2.5. Estabilidad del ALA-D encapsulada en eritrocitos, *in vitro*

Se estudió la estabilidad de los fantasmas de eritrocitos cargados con enzima bajo diferentes condiciones de estabilización.

En una primera experiencia se trató de estabilizarlos incubándolos, luego de resellados, durante 30 minutos a 37 °C, manteniéndolos en igual volumen de buffer salino (buffer fosfato de sodio pH 6,8 0,05 M en solución fisiológica), o en solución de ACD, que es un conservador común de GR, durante 24 horas a 4 °C.

También, para restituir posibles factores estabilizadores, se utilizó como solución hemolizante un dializado de eritrocitos normales, denominada DEN obtenida de la siguiente manera: los GR se hemolizan por contacto con igual volumen de buffer fosfato de sodio pH 7,4 1 mM y posterior congelamiento y descongelamiento 3 veces. Se centrifuga 15 minutos a 10.000 rpm y se descarta el precipitado. El sobrenadante se lleva a 20 ml con el mismo buffer y se dializa contra ese mismo buffer durante 18 horas. De esta

manera deberían conservarse los factores estabilizantes de alto PM.

Con esta solución hipotónica se prepararon los fantasmas procediéndose luego de la manera habitual, estabilizándolos 30 minutos a 37 °C ó no.

Los resultados se muestran en la Tabla IX. Puede verse que la actividad remanente luego de 24 horas estuvo siempre alrededor del 50%, mientras que los GR conservan el 80% de la actividad del ALA-D luego de 24 horas.

TABLA IX: Estabilidad del ALA-D encapsulada en eritrocitos, *in vitro*

	Tiempo		Actividad remanente (%)
	0	24 hs.	
FGRn	0,1887	0,0936	49,6
FGRn estabilizados 30'	0,3157	0,1536	48,6
FGRn DEN	0,2725	0,1033	37,9
FGRn DEN estabilizado 30'	0,3604	0,1640	45,5
FGRn mantenidos en ACD	0,2056	0,0565	27,5
GRn	0,5424	0,4717	87,0

Se trató de estabilizar los fantasmas de eritrocitos normales cargados con ALA-D (FGRn) utilizando diferentes métodos, como se describe en el texto, determinándose la actividad inmediatamente y luego de 24 horas. DEN: Dializado de eritrocitos normales.

En base a estos resultados, en lo sucesivo los fantasmas se utilizaron dentro de las 2 horas de preparados.

II.A.2.6. Niveles de ALA-D de eritocitos sin tratar y fantasmas cargados con enzima

La Tabla X muestra que el ALA-D puede encapsularse en eritrocitos humanos, de conejos, de ratas y de ratones normales e intoxicados con Pb.

La actividad de los eritrocitos de un hombre normal era de 448,6 U/ml GR antes del rellenado. Cuando se lo somete al proceso de hemólisis en ausencia de enzima, parte del contenido intracelular de enzima se pierde, así como se pierde parte de la Hb intracelular, y es de esperar que las células sean parcialmente deficientes en sus niveles de ALA-D. Así, los llamados fantasmas vaciados tienen una actividad de ALA-D disminuida en un 25%. Cuando la solución hemolizante contenía ALA-D de sangre humana, el eritrocito cargado tenía una actividad ligeramente mayor que el control.

TABLA X: Actividad de ALA-D de los eritrocitos sin tratar, cargados y vaciados.

Tipo de eritrocito	Actividad de ALA-D (U/ml)			
	Humano	Conejo	Rata	Ratón
GRn	448,6	500,9	143,6	604,1
GRi	236,8	200,0	69,0	77,1
FGRn	342,8	229,0	44,4	177,8
FGRn(ALA-D)	598,2	467,4	113,8	514,2
FGRi	245,0	218,1	44,2	46,1
FGRi(ALA-D)	567,0	685,1	60,4	71,8

Los fantasmas de glóbulos rojos vaciados (FGR) o cargados con ALA-D humana purificada (FGR(ALA-D)) se prepararon a partir de sangre de humanos y animales normales (n) o intoxicados (i) como se describe en Materiales y Métodos.

Las células de un paciente intoxicado con Pb tenían reducido en un 50% la actividad de ALA-D comparada con los valores normales, lo mismo que los correspondientes fantasmas vacíos, pero cuando estos eritrocitos defectuosos en ALA-D se cargaban con enzima, la actividad de ALA-D podía alcanzar valores dentro del rango fisiológico normal.

También se muestra en esta Tabla que se obtuvieron resultados muy similares usando eritrocitos de conejos normales e intoxicados.

Cuando se realizaron los mismos experimentos con ratas y ratones, las células normales cargadas y vaciadas mostraron respuestas similares a las de humanos y conejos; pero, aunque el ALA-D podía incorporarse en los eritrocitos de animales intoxicados, mientras los niveles de los correspondientes fantasmas vacíos estaban dentro del rango esperado, los de las células cargadas no alcanzaban los valores control. De todas maneras, como la incorporación de enzima por los glóbulos rojos ha demostrado ser proporcional a su concentración externa, pueden usarse concentraciones de ALA-D mayores que las empleadas en estas experiencias, de manera de aumentar la eficiencia de relleno en el caso de las células de ratas y ratones defectivos y obtener finalmente niveles de ALA-D en FGRi(ALA-D) dentro del rango normal.

II.A.2.7. Eficiencia de la incorporación. Partición del ALA-D entre las células y el espacio extracelular

Se ha propuesto que, durante el relleno, las macromoléculas se distribuyen de igual manera en el interior del eritrocito y la solución exterior, sin embargo, se ha encontrado que algunas proteínas responden a este comportamiento en tanto que otras no (Rechsteiner, 1978) y que el grado de encapsulamiento también depende del peso molecular de la proteína (Ihler y col, 1973).

Por micrografía electrónica se ha demostrado (Seeman, 1967) que se forman poros grandes (200-500 Å) en la membrana celular durante el transcurso de la lisis hipotónica, los cuales permiten el equilibrio de las soluciones intra y extracelular. Además Rechsteiner (1978) ha propuesto que el relleno con proteínas neutras o acídicas de diámetro menor de 100 Å es un fenómeno altamente probable. Otro factor limitante, en la obtención de fan

tasmas cargados con enzimas activas es la estabilidad misma de la enzima. En consecuencia, considerando que el ALA-D es una proteina ligeramente acídica, que podemos obtener con facilidad una preparaci3n muy estable de ALA-D altamente purificada y que el diámetro aproximado del ALA-D es de 85-90 Å (Wu y col., 1974), esperábam3s obtener una buena incorporaci3n del ALA-D en fantasmas de eritrocitos bajo las condiciones experimentales descritas.

TABLA XI: Concentraci3n del ALA-D intra y extracelular luego del relleno de los fantasmas de eritrocitos

	Actividad de ALA-D (U/ml)			
	Humano	Conejo	Rata	Rat3n
FGRi(ALA-D)	567,0	685,5	71,8	60,4
Sobrenadante	263,0	737,9	77,1	55,2
Equilibrio (%)	215,0	93,0	93,0	109,0
Unidades recuperadas (%)	100	100	80	64

Los GR obtenidos de pacientes y animales de experimentaci3n intoxicados con Pb se cargaron con ALA-D purificada de sangre humana como se describe en Materiales y M3todos. El % de recuperaci3n se calcul3 sobre la base de las unidades de ALA-D soluble agregadas y las recuperadas en los fantasmas cargados.

Se observ3 (Tabla XI) que trabajando con c3lulas de conejos, ratas y ratones, se alcanza pr3cticamente el equilibrio, con una concentraci3n de ALA-D casi igual en los eritrocitos y el espacio extracelular, y una eficiencia de encapsulamiento superior al 70% usando sangre de rata y rat3n, y mayor al 100% usando sangre humana y de conejo, encontrándose por ello, mayores concentraciones de ALA-D en los eritrocitos humanos y de conejo cargados que en las correspondientes soluciones hemolizantes. Como se ha observado que el resellado ocurre casi instantáneamen

te por un simple lavado con solución salina luego de la hemólisis, es probable que en estas experiencias en particular, la membrana se reselle espontáneamente durante la lisis hipotónica aún antes del agregado de la solución de cloruro de sodio concentrado. También se ha indicado que ocurre un significativo aumento del volumen del eritrocito durante la hemólisis, de manera que la mayor concentración de ALA-D capturada dentro del eritrocito en relación a la encontrada en el sobrenadante, puede explicarse al menos en parte, por este aumento del volumen celular y cierre de los poros en la membrana antes de la restauración de la isotonicidad. De todas maneras es probable que haya otras razones que expliquen este fenómeno.

II.A.2.7. Conclusiones

En conclusión se han determinado las condiciones óptimas para la preparación de fantasmas de eritrocitos de diferentes fuentes y para el encapsulamiento del ALA-D.

Se ha desarrollado así un procedimiento que permite atrapar con alto rendimiento enzima altamente purificada y estable obtenida de sangre humana.

Se ha demostrado que la actividad reducida de ALA-D en eritrocitos provenientes de pacientes o animales intoxicados por plomo, puede recuperar los niveles fisiológicos normales cuando se los carga con enzima exógena.

PARTE II B

USO DE LOS FANTASMAS DE ERITROCITOS EN EL TRATAMIENTO DE LA INTOXICACION POR PLOMO

II.B.1. Estudios <i>in vitro</i>	221
II.B.1.1. Corrección <i>in vitro</i> de eritrocitos deficientes en ALA-D en la intoxicación por Pb	221
II.B.2. Estudios <i>in vivo</i>	224
II.B.2.1. Experiencias con el modelo animal	224
II.B.2.1.1. Tratamiento de animales intoxicados por plomo con fantasmas cargados con ALA-D	225
II.B.2.1.2. Tratamiento de animales intoxicados por plomo con ALA-D libre	228
II.B.2.1.3. Tratamiento de animales intoxicados por plomo con sangre normal entera autóloga	230
II.B.2.1.4. Recuperación natural de los animales intoxicados por Pb	231
II.B.2.1.5. Tratamiento de animales normales con fantasmas de eritrocitos autólogos cargados con ALA-D	233
II.B.2.1.6. Análisis comparativo de la respuesta de animales intoxicados sometidos a los distintos tratamientos y de animales normales a los cuales se les administraron fantasmas cargados con la enzima	234
II.B.2.1.7. Conclusiones	238
II.B.2.2. Paciente. Primera aplicación de la terapia por reemplazo enzimático en un caso humano de intoxicación crónica por Pb	239
II.B.2.2.1. Preparación de los fantasmas autólogos conteniendo el ALA-D	239
II.B.2.2.2. Paciente. Observaciones clínico-bioquímicas	239

II.B.2.2.3. Aplicación de la terapia por reem-
plazo enzimático

244

II.B. USO DE LOS FANTASMAS DE ERITROCITOS EN EL TRATAMIENTO DE LA INTOXICACION POR PLOMO

II.B.1. ESTUDIOS IN VITRO

II.B.1.1. Corrección *in vitro* de eritrocitos deficientes en ALA-D en la intoxicación por Pb

Hemos visto que los eritrocitos deficientes en ALA-D de humanos y animales intoxicados por Pb pueden alcanzar los valores fisiológicos normales cuando se los carga con ALA-D de sangre humana exógena (Tabla X). Como un estudio preliminar para posibles intentos de reemplazo enzimático en animales y luego en el hombre se diseñaron una serie de experimentos tendientes a demostrar la capacidad de estas preparaciones de fantasmas cargados para corregir, *in vitro*, la deficiencia de ALA-D en la intoxicación por Pb.

Se mezclaron GR de humanos y normales intoxicados por Pb con eritrocitos cargados con ALA-D de la misma fuente, a diferentes relaciones de volumen (Figuras 24 y 25).

En todos los casos se encontró que la adición de fantasmas cargados a GR defectuosos de humanos y conejos, en cualquier relación, aumentaba significativamente la actividad de ALA-D. En las relaciones 0,5:1 y 1:1 (FGR (ALA-D):GR; v:v) los niveles alcanzaban los valores normales y eran aún mayores cuando se usaba la relación 0,25:1 (Figura 24).

La Figura 25 muestra resultados similares obtenidos con ratas y ratones cuando se agregan FGR(ALA-D) a células deficientes. Cuando se mezclan eritrocitos normales con fantasmas cargados provenientes de células normales o deficientes, se encontró un comportamiento similar, excepto que los niveles de actividad alcanzados eran menores que los obtenidos con eritrocitos de animales intoxicados por Pb.

En conclusión, estos estudios demuestran que pueden alcanzarse valores fisiológicos de actividad incorporando ALA-D altamente purificada de sangre humana en eritrocitos normales y deficientes, lo cual es un resultado muy importante en relación al posible uso de la terapia por reemplazo enzimático *in vivo*.

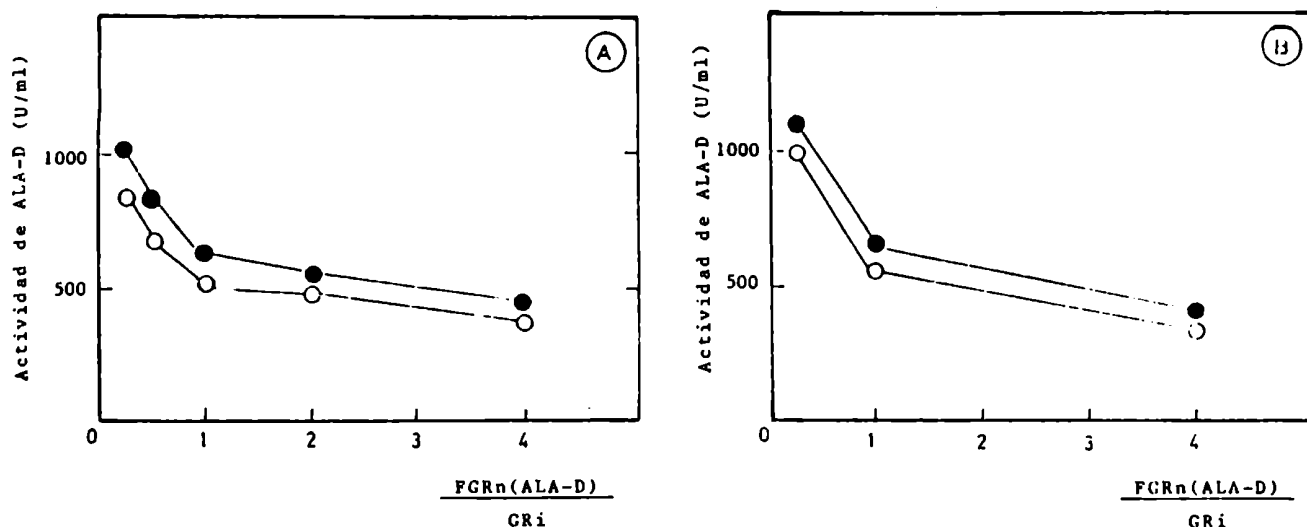


FIGURA 24: Corrección *in vitro* de la actividad de ALA-D de eritrocitos humanos y de conejo. Se cargaron fantasmas de eritrocitos de pacientes (A) y conejos (B) normales e intoxicados con ALA-D altamente purificada como se describe en Materiales y Métodos. Se agregaron diferentes volúmenes de fantasmas cargados FGR(ALA-D) a células defectivas (GRi) en las relaciones 0,25:1; 0,5:1; 1:1; 2:1 y 4:1 (FGRi(ALA-D): GRi; v:v) y se estudió la actividad de las mezclas resultantes. (○) mezcla de GRi con FGRn(ALA-D); (●) mezcla de GRi con FGRi(ALA-D). Los niveles de actividad de ALA-D fueron: Humanos $GR_n = 856$ U/ml; GRi = 728,3 U/ml; conejos: $GR_n = 500,9$ U/ml; GRi = 200,0 U/ml.

Las experiencias *in vitro* también indican que los eritrocitos cargados con ALA-D son funcionalmente activos cuando se simulan condiciones *in vivo*. La actividad reducida del ALA-D de los GR de pacientes y animales intoxicados por Pb puede aumentarse, ya sea introduciendo directamente la enzima dentro de ellos o mezclando las células defectivas con los eritrocitos cargados con ALA-D en la relación óptima de 0,25 de fantasmas cargados por unidad de volumen de eritrocitos deficientes. Los datos de estas experiencias de corrección *in vitro* fueron sumamente alentadores, con respecto a la inmediata realización de los estudios

in vivo, indicando entonces que el ALA-D incorporada en los eritrocitos puede superar el defecto enzimático asociado a la intoxicación por Pb, reafirmando su utilidad como potencial carrier del ALA-D *in vivo*.

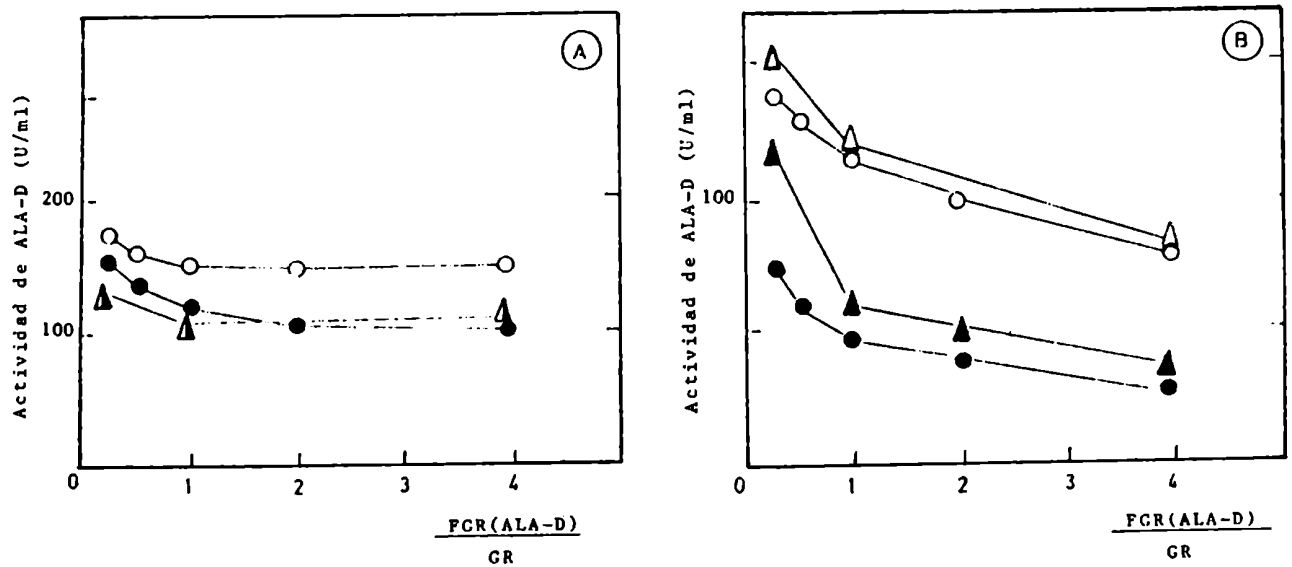


FIGURA 25: Corrección *in vitro* de la actividad de ALA-D de eritrocitos de rata y de ratón. Las condiciones experimentales son las mismas que las descritas en la leyenda de la Figura 24, excepto que se incluyen datos de la mezcla de GR normales con FGR normales e intoxicados cargados con ALA-D.
 (\circ): GRi + FGRn(ALA-D); (\bullet) GRi + FGRi(ALA-D);
 (Δ) GRn + FGRn(ALA-D) y (\blacktriangle) GRn + FGRi(ALA-D).
 Los niveles de actividad de ALA-D fueron: (A) ratas: GRn = 143,6 U/ml; GRi = 69,0 U/ml; (B) ratones: GRn = 604,1 U/ml; GRi = 77,1 U/ml.

II.B.2. ESTUDIOS IN VIVO

II.B.2.1. Experiencias con el modelo animal

Recordemos que para poder aplicar con éxito la terapia por reemplazo enzimático, se deben satisfacer varios criterios: i) es necesario desarrollar un carrier que proteja tanto a la enzima de su degradación e inactivación, como al huésped de los conocidos e indeseados efectos inmunológicos y farmacológicos; ii) se debe seleccionar cuidadosamente la fuente de enzima; este aspecto es de suma importancia; en particular cuando se planea usarla en terapia humana, la enzima debe ser del mismo origen; iii) la preparación de la enzima debe ser de la mayor pureza posible y muy estable; iv) la enzima debe liberarse en el sitio justo de acción; v) la enzima debe interaccionar con su sustrato el tiempo suficiente como para producir efectos clínicos satisfactorios.

Hasta esta altura del trabajo se habían logrado resolver los tres primeros aspectos por cuanto se desarrolló un método para la obtención de una preparación de ALA-D altamente purificada, y muy estable a partir de sangre humana, que se encapsuló con alto rendimiento en fantasmas de eritrocitos isólogos o autólogos, los cuales parecen constituir el carrier ideal.

Por otro lado, los datos obtenidos con los modelos experimentales anteriores, simulando condiciones *in vivo*, demostraron que era posible corregir *in vitro* la actividad reducida del ALA-D eritrocitaria, proveniente de humanos o animales intoxicados por plomo, mediante el agregado de los fantasmas de glóbulos rojos conteniendo la enzima purificada.

Ahora bien, la simple administración de la enzima activa no tendrá el efecto esperado si no puede alcanzar y actuar en el lugar preciso. De acuerdo a nuestra hipótesis, el principal sitio de acción del ALA-D atrapada en fantasmas de eritrocitos, en la intoxicación por plomo sería en sangre circulante; y además su efecto tendría que ser suficientemente prolongado como para reducir el número de transfusiones necesarias cuando se tratara de enfermedades genéticas, lo cual también se cumpliría en el caso del empleo de los fantasmas de eritrocitos, por cuanto se ha demostrado que éstos mantienen muchas de las propiedades de los glóbulos

rojos intactos (Beutler y col, 1977b, 1980; Ihler, 1979). Según el modo de preparación, pueden mantenerse en circulación por lo menos hasta 120 días, que es la vida media del eritrocito humano. Si además se considera que siempre tenemos una población de glóbulos rojos de edad heterogénea, y que tanto los eritrocitos más viejos, como los dañados se eliminan rápidamente de la circulación por el sistema retículo endotelial, siendo secuestrados principalmente por el hígado y el bazo, sería posible entonces controlar la velocidad de liberación y acción de la enzima encapsulada en la circulación dentro de intervalos que podrían variar desde minutos a semanas; como también su destino final, modificando en grado variable, la membrana eritrocítica (Rifkind, 1966).

Fue importante, en consecuencia, determinar si la administración de los fantasmas cargados con la enzima respondía a los criterios restantes establecidos para su aplicación en la terapia enzimática.

Estos aspectos fundamentales se estudiaron entonces empleando el modelo animal, como etapa previa a su posible extensión a casos humanos.

II.B.2.1.1. Tratamiento de animales intoxicados por plomo con fantasmas cargados con ALA-D

Se emplearon ratas y ratones de distintas cepas intoxicados con dosis de 2-4 mg de acetato de plomo por kg de peso, a los cuales se les administró el ALA-D encapsulada en glóbulos rojos. Tanto en esta serie de ensayos como en los siguientes, se trabajó siempre paralelamente con un lote de animales controles no intoxicados.

En la Figura 26 se ilustran los resultados de una experiencia, en la cual se emplearon ratones hembras, de un peso aproximado de 30 g, cepa CF1, que habían recibido una dosis única de 3 mg de acetato de plomo/kg de peso, 20 horas antes de iniciado el tratamiento con la enzima, el cual consistió en la administración de una sola dosis de 0,5 ml de fantasmas autólogos, conteniendo 773 unidades de ALA-D/ml, inyectados por la vena de la cola. A los tiempos indicados se sacrificaron los animales, determinándose la actividad del ALA-D en eritrocitos, hígado, bazo y riñón. La actividad de los controles normales se tomó siempre como 100%.

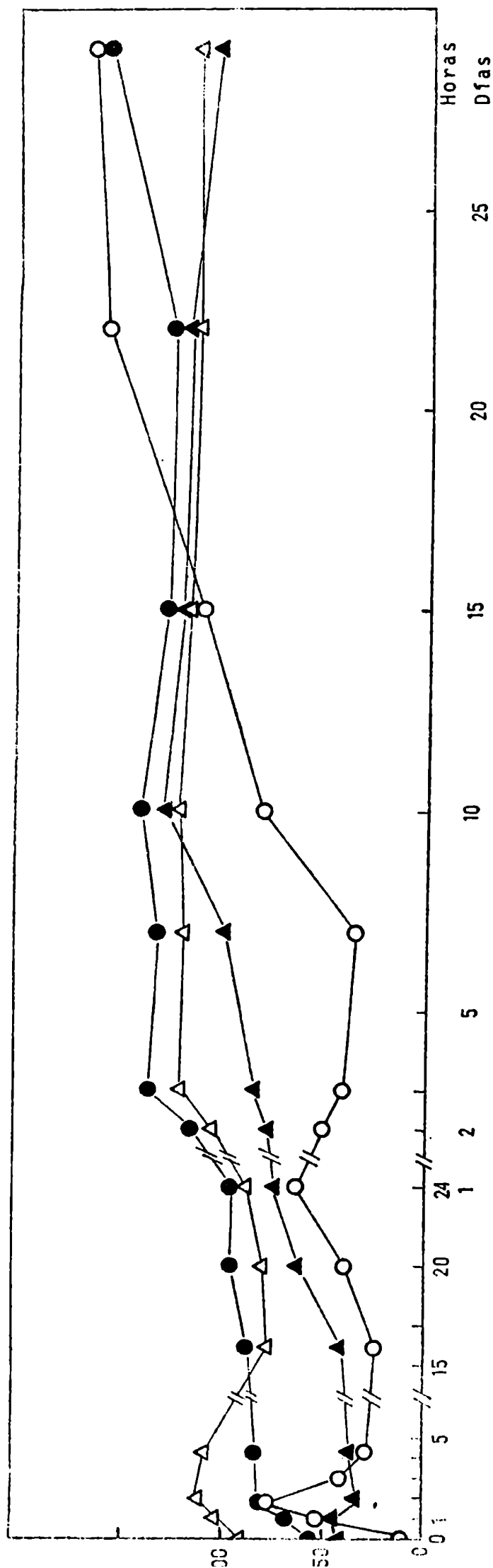


FIGURA 26: Efecto de la administración de fantasmas de eritrocitos autólogos, cargados con ALA-D sobre los niveles del ALA-D, eritrocitaria (O), hepática (●), de bazo (Δ), de riñón (\blacktriangle), en ratones intoxicados por plomo.

Los animales recibieron una sola dosis de enzima encapsulada a tiempo 0. Los niveles de actividad enzimática de los animales intoxicados con respecto a los normales, a tiempo 0 fueron: en eritrocitos 12%, en hígado 55%, en bazo 89% y en riñón 40% y las actividades de ALA-D en nmoles de PBG/ml GR en los animales control no intoxicados fueron 215,3 en eritrocitos; 134,8 en hígado; 105,1 en bazo y 50,0 en riñón. Los demás detalles experimentales se dan en el texto. La metodología empleada se describe en Materiales y Métodos.

Con respecto al perfil del ALA-D eritrocitaria, se observó, en todos los casos, una rápida recuperación de la actividad a la hora, con un máximo a las 2 horas, para luego descender, entre las 3 y las 20 horas hasta niveles menores pero siempre superiores a los iniciales, que en este ensayo fueron 12% del control. A las 24 horas, nuevamente se produjo una elevación del ALA-D seguida de otro descenso, menor que el anterior; así se mantuvo durante la primer semana, al cabo del 7° día, por tercera vez la actividad comenzó a sufrir un incremento casi constante hasta las tres semanas, con una tendencia a la estabilización al cabo de un mes; este último aumento superó significativamente los niveles de los controles.

En consecuencia, resultó evidente que la administración del ALA-D encapsulada a los animales intoxicados, produjo una significativa recuperación de la actividad del ALA-D eritrocitaria inhibida en un 90% al inicio del tratamiento, efecto que se mantuvo por lo menos hasta el mes, indicando, que la enzima atrapada en los fantasmas circulantes es lo suficientemente estable como para retener su actividad y seguir actuando mientras que el eritrocito permanece en circulación, y además que una buena proporción de los fantasmas conservan las propiedades de los eritrocitos intactos y no han sido dañados durante el proceso de lisis y resellado.

En todos los ensayos y con distintos lotes y tipos de animales, el comportamiento fue similar, sólo es interesante acotar que la mayor o menor intensidad de la respuesta dependió, de la dosis de enzima; así, cuando la preparación de fantasmas cargados fue más activa, las señales iniciales fueron más agudas.

Un análisis del comportamiento de la enzima de hígado y bazo; nos muestra una reactivación casi inmediata, recuperando los niveles normales en pocas horas y manteniéndose aún por encima de ellos a partir del segundo día hasta el mes. Estos datos están indicando que una cierta proporción de los fantasmas estaban dañados y fueron capturados rápidamente por los órganos encargados de eliminarlos de la circulación; pero al mismo tiempo también nos hablan de la estabilidad de la enzima atrapada en los fantasmas capturados por las células fagocíticas.

Finalmente, el riñón parece recobrar su actividad lentamente. Dado que se trata de un órgano con muy baja capacidad de cap

tura (Ihler, 1982), con sólo estos datos no podemos atribuirlo a un efecto de la enzima de fantasmas, sino más probablemente a una recuperación natural.

II.B.2.1.2. Tratamiento de animales intoxicados por plomo con ALA-D libre

A pesar de las conocidas complicaciones inmunológicas, la administración de L-asparaginasa para el tratamiento de la leucemia constituye todavía hoy una de las aplicaciones más exitosas de la terapia enzimática (Ihler, 1982). Se han obtenido también algunos resultados alentadores inyectando intravenosamente grandes cantidades de glucocerebrosidasa libre purificada de placenta humana, directamente a pacientes con la enfermedad de Gaucher (Brady y col, 1974). Sin embargo no hace falta recordar los numerosos problemas prácticos asociados con la introducción de una proteína extraña en el organismo.

De todas maneras, era importante establecer el comportamiento de nuestro modelo animal frente a la administración de ALA-D libre.

Se emplearon ratones hembras cepa CF1, de 30 g, que recibieron una dosis de 3 mg de acetato de plomo/kg, 20 horas antes de administrarles una sola dosis de 0,1 ml de ALA-D purificada de sangre humana, con una actividad de 6.600 nmoles PBG/ml, inyectada por la vena de la cola.

Es importante notar que varios animales murieron mientras se les inyectaba la enzima, algunos reaccionaron normalmente en tanto que otros presentaron contracciones, acompañadas de muestras de dolor y malestar general durante tiempos variables, luego de lo cual se fueron recuperando lentamente.

A intoxicados y controles se efectuó el mismo tratamiento que en las experiencias administrando enzima encapsulada.

Los resultados obtenidos se ilustran en la Figura 27. Puede observarse que la enzima libre produce inicialmente una reactivación del ALA-D eritrocitaria, pero es eliminada de la circulación después de las 2 horas, de manera que en poco tiempo la actividad circulante está nuevamente en los niveles iniciales y no hay posterior recuperación. La rápida eliminación de la enzi-

ma libre se evidencia también en los perfiles correspondientes al hígado y bazo. La respuesta del riñón no agrega nada en particular.

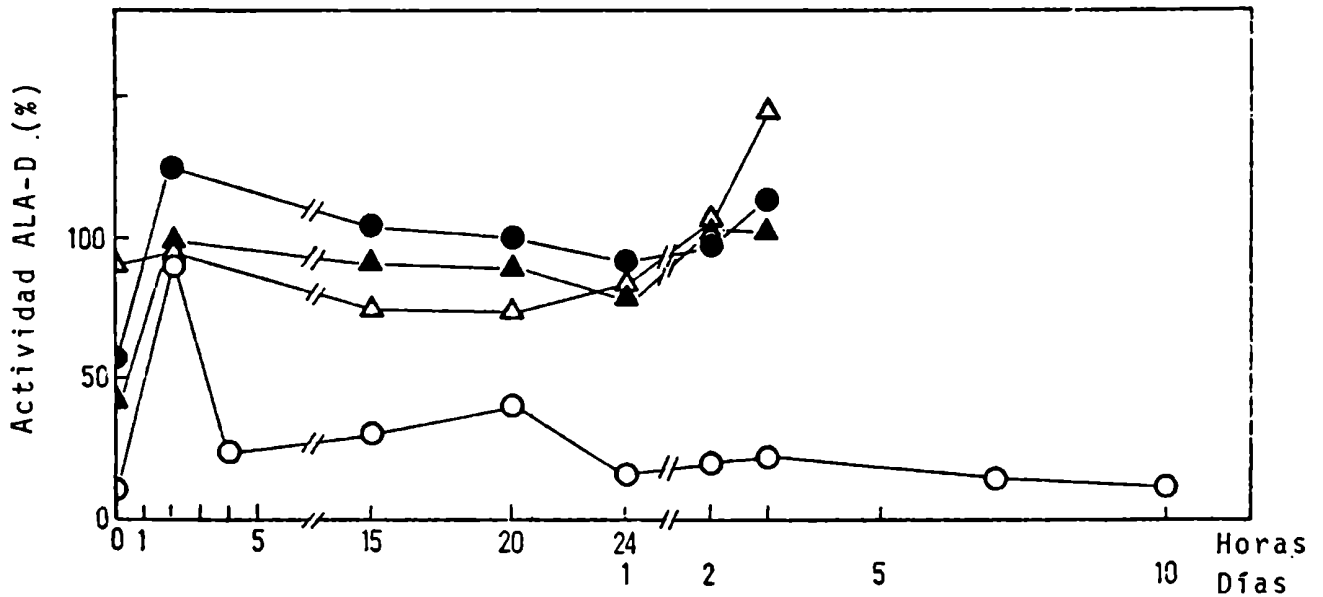


FIGURA 27: Efecto de la administración de enzima exógena libre sobre los niveles de ALA-D, eritrocitaria (○), hepática (●), de bazo (△), de riñón (▲) en ratones intoxicados por plomo. Los animales recibieron una dosis de enzima a tiempo 0. Los niveles de actividad de los animales intoxicados a tiempo 0 fueron los indicados en la leyenda de la Figura 26. Las actividades de ALA-D en nmPBG/ml en los animales controles no intoxicados fueron: 215,3 en eritrocitos; 145,0 en hígado; 79,5 en bazo y 42,0 en riñón. Los demás detalles experimentales y la metodología empleada se describen en el texto y Materiales y Métodos respectivamente.

Aún es poco lo que se sabe sobre el mecanismo de captura de enzimas libres y acerca del efecto de la enzima sobre su sustrato en el tejido que la ha incorporado; sin embargo, en este

caso en particular podemos concluir que la administración del ALA-D libre no resulta beneficiosa para el tratamiento de la intoxicación por plomo; dado que no tiene acción alguna sobre la actividad del ALA-D en la sangre circulante; de manera que no habrá disminución de los niveles incrementados de su sustrato ALA que continuará produciendo, entre otros, los conocidos efectos a nivel neurológico, asociados con la intoxicación por plomo.

II.B.2.1.3. Tratamiento de animales intoxicados por plomo con sangre normal, entera autóloga

En realidad la terapia por reemplazo enzimático ha sido practicada por lo menos por dos generaciones de médicos, que han transfundido sangre entera fresca a pacientes con problemas de coagulación. En estos casos la enzima que estaban reemplazando era una protefna plasmática.

De manera que nos pareció también de interés, establecer la respuesta de los animales intoxicados por plomo a una transfusión de sangre normal entera autóloga.

A un lote de ratones hembra cepa CF1 intoxicados en igual forma que en las dos experiencias anteriores se les administró 0,5 ml de sangre de animales normales de la misma familia. Luego de la aplicación se trataron como antes y los resultados se muestran en la Figura 28.

Hubo una muy ligera recuperación del ALA-D eritrocitaria a la hora de comenzado el tratamiento, pero ya a las 4 horas, el nivel de la enzima había caído al valor inicial de la intoxicación, y no volvió a recuperarse.

La actividad del ALA-D en hígado y bazo, así como en riñón, fue aumentando lentamente hasta los 3 días acercándose a los datos normales, correspondiendo estos cambios muy probablemente a una recuperación natural.

En conclusión, una simple transfusión sanguínea tampoco tendría efectos beneficiosos en la intoxicación por plomo.

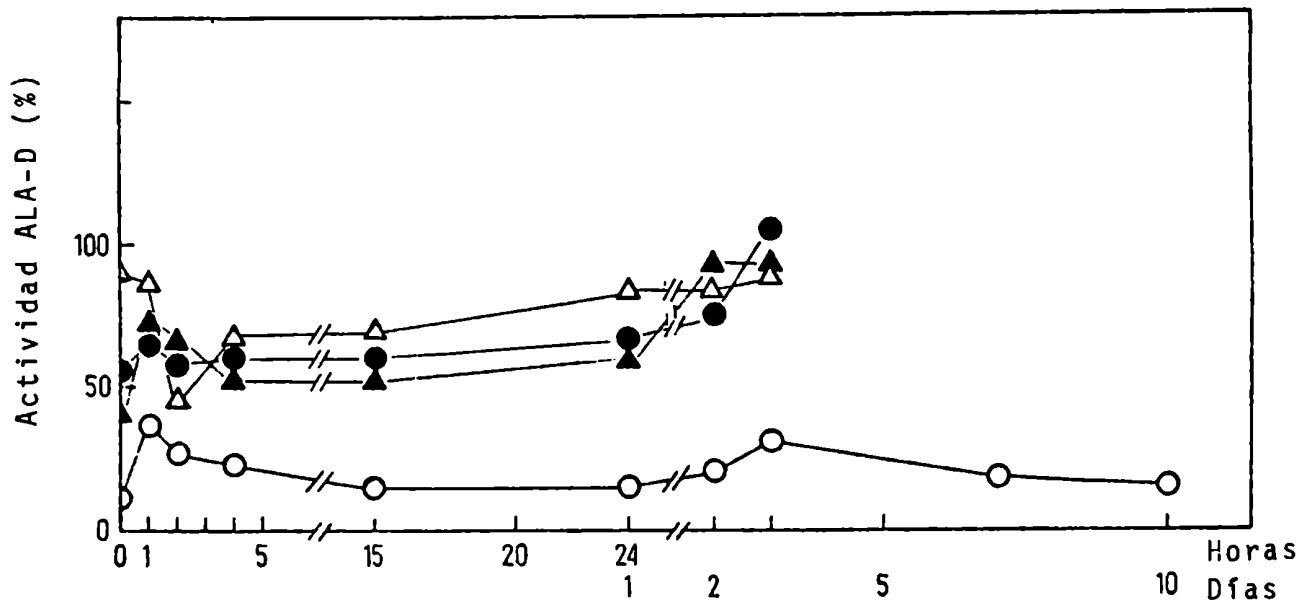


FIGURA 28: Efecto de la administración de sangre entera autóloga, sobre los niveles de ALA-D, eritrocitaria (○), hepática (●), de bazo (△) y de riñón (▲) en ratones intoxicados, aplicada a tiempo 0.

Las actividades de ALA-D en nmoles PBG/ml en los animales controles no intoxicados fueron: 340,8 en eritrocitos; 176,6 en hígado; 126,4 en bazo y 38,5 en riñón. El resto de las condiciones experimentales son similares a las indicadas en las leyendas de las Figuras 26 y 27.

II.B.2.1.4. Recuperación natural de los animales intoxicados por plomo

Es bien conocido el hecho de que una de las primeras medidas que se adopta en un caso de intoxicación por plomo, es el alejamiento o separación del paciente de la fuente productora del daño.

En consecuencia, para la evaluación final de la terapia por reemplazo enzimático, empleando fantasmas de eritrocitos cargados con enzima, deberá tenerse también en cuenta el comportamiento de los animales intoxicados, sin tratamiento posterior alguno, a lo largo del tiempo, luego de haber recibido, como en las experiencias anteriores una única dosis de 3 mg de acetato de plomo/kg de peso. Se emplearon ratones hembras de iguales características, tratados asimismo en condiciones análogas a las ya descritas.

En la Figura 29 se muestran los resultados obtenidos.

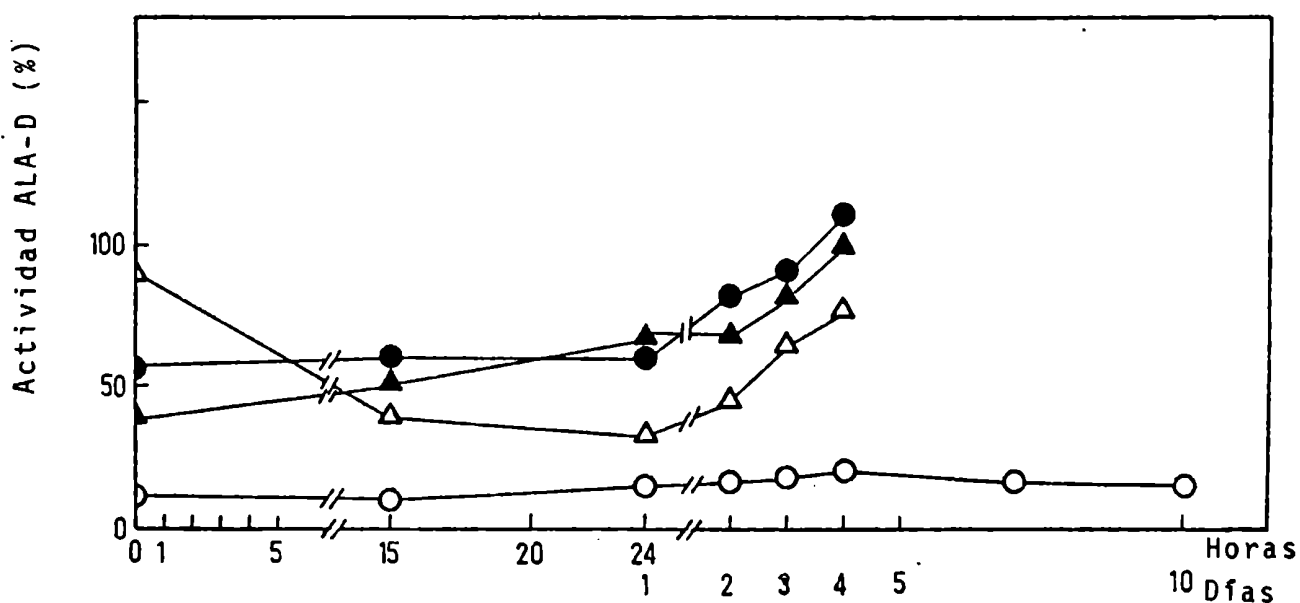


FIGURA 29: Cambios en la actividad del ALA-D, eritrocitaria (○), hepática (●), de bazo (△) y de riñón (▲), en animales intoxicados por plomo, a lo largo del tiempo luego de haber recibido una sola dosis de 3 mg de acetato de plomo/kg de peso. Las actividades de ALA-D en nmoles PBG/ml en los animales controles no intoxicados fueron: 340,8 en eritrocitos; 200,4 en hígado; 66,8 en bazo y 49,0 en riñón. El resto de las condiciones experimentales son similares a las indicadas en las leyendas de las Figuras 26 y 27.

Observamos que no hay recuperación del ALA-D eritrocitaria, en tanto que en hígado y riñón, recién comienza a las 24 horas; es llamativa la respuesta en bazo, que muestra una reacción más lenta de este órgano frente al Pb, apreciándose una mayor inhibición a las 24 horas; luego de lo cual, también empieza a recobrar la actividad. Pero de todas maneras, el proceso es lento en estos tres órganos y nulo en eritrocitos.

II.B.2.1.5. Tratamiento de animales normales con fantasmas de eritrocitos autólogos cargados con ALA-D

Existe relativamente poca información acerca del efecto *per se* de la administración *in vivo* de fantasmas de eritrocitos ya sea como tales o conteniendo proteínas o drogas; sin embargo los datos existentes (Green y col, 1980; Beutler y col, 1977 b) parecen indicar que su aplicación no produce ningún efecto adverso sobre el organismo.

De todas maneras, para completar este cuadro de ensayos, se estudió el comportamiento de animales normales, no intoxicados, a los cuales se le administraron fantasmas de eritrocitos autólogos cargados con ALA-D, en la misma forma en que fueran aplicados a los animales intoxicados por plomo.

Se trabajó en idénticas condiciones, con el mismo tipo de animales que en todas las experiencias anteriores y los resultados obtenidos se ilustran en la Figura 30.

Observamos que nuestros datos están de acuerdo con los de los autores mencionados antes, en el sentido de que, la administración de los fantasmas cargados no afecta significativamente la actividad del ALA-D en ninguno de los tejidos.

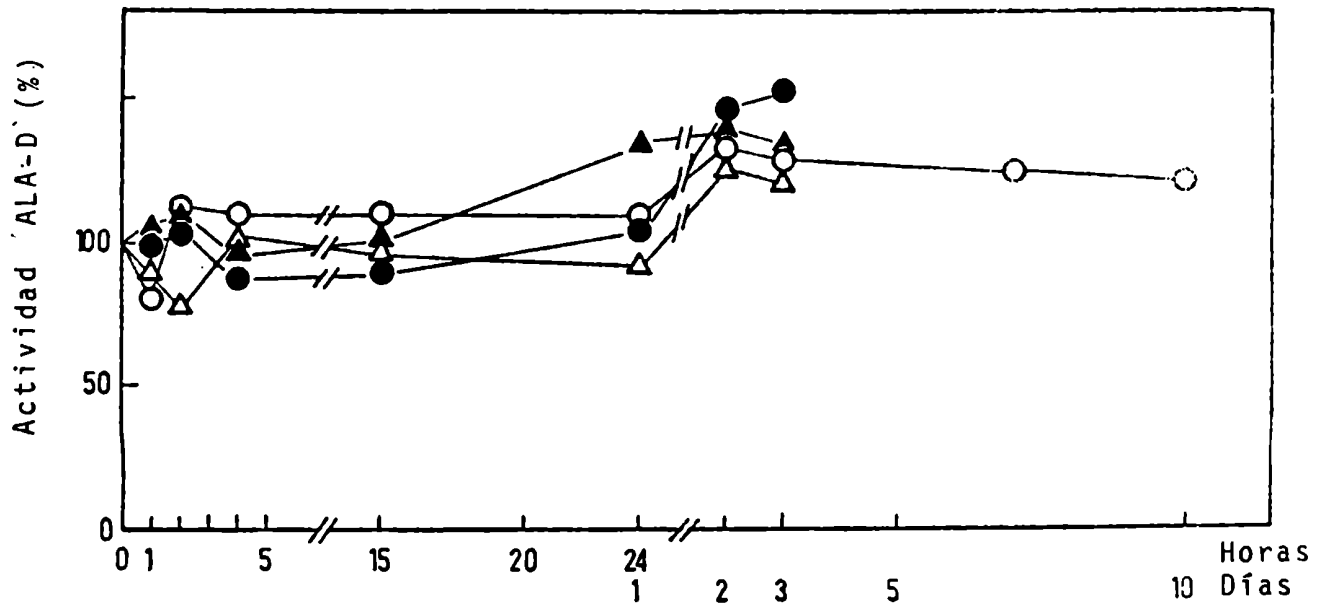


FIGURA 30: Efecto de la administración de fantasmas de eritrocitos autólogos cargados con ALA-D sobre los niveles de ALA-D, eritrocitaria (○), hepática (●), de bazo (△) y de riñón (▲), en animales normales (no intoxicados). Los animales recibieron una sola dosis de ALA-D encapsulada a tiempo 0. Las actividades de ALA-D en nmol PBG/ml iniciales fueron: 411,0 en eritrocitos; 167,7 en hígado; 96,0 en bazo y 41,2 en riñón. El resto de las condiciones experimentales son similares a las indicadas en la leyenda de la Figura 27.

II.B.2.1.6. Análisis comparativo de la respuesta de animales intoxicados sometidos a los distintos tratamientos y de animales normales a los cuales se les administraron fantasmas cargados con enzima

El hecho más saliente que surge, de todo el conjunto de ensayos realizados con el modelo animal, es que los cambios más impor

tantes, desde el punto de vista de la aplicación de la terapia enzimática en la intoxicación por plomo, se producen a nivel de la sangre circulante. Recordemos una vez más que es precisamente el ALA-D de eritrocitos uno de los parámetros más sensibles para un diagnóstico temprano de este tipo de intoxicación.

La eficacia del tratamiento por reemplazo enzimático, empleando fantasmas de eritrocitos autólogos cargados con ALA-D, se ilustra claramente en la Figura 31.

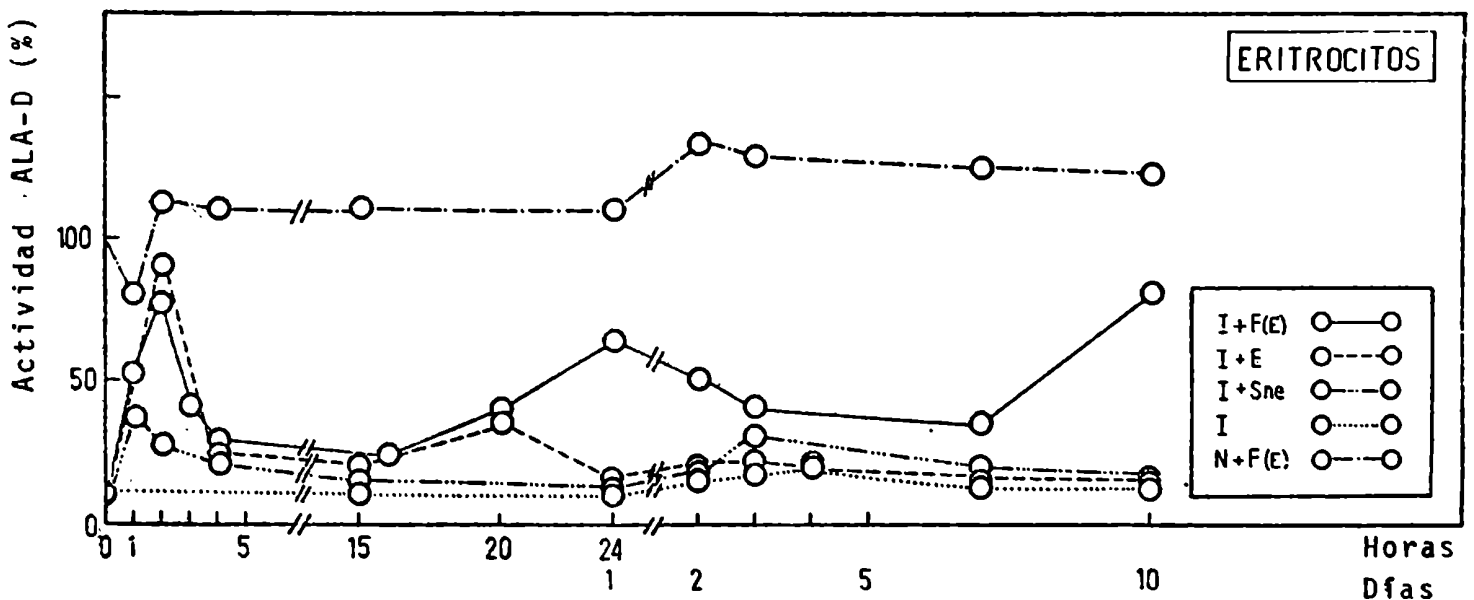


FIGURA 31: Comparación entre la respuesta del ALA-D eritrocitaria en los animales intoxicados sometidos a distintos tratamientos y en animales normales a los cuales se le administraron fantasmas cargados con enzima.
 I: animales intoxicados; N: animales normales; F(E): fantasmas de eritrocitos cargados con la enzima ALA-D; E: enzima libre; sne: sangre normal entera.

Es evidente que ninguno de los otros tres tratamientos puede igualar la respuesta de la administración de enzima encapsulada en fantasmas, que de por sí no produce ningún efecto adverso sobre los animales normales.

Por otro lado, un rápido análisis de lo que sucede en los otros tres órganos, no hace más que enfatizar el carácter protector del hígado (Figura 32) y bazo (Figura 33), que rápidamente secuestran de la circulación al elemento extraño, o que naturalmente recobran su actividad, cuando no hay más ingreso de Pb al organismo, o simplemente se aplica una transfusión sanguínea.

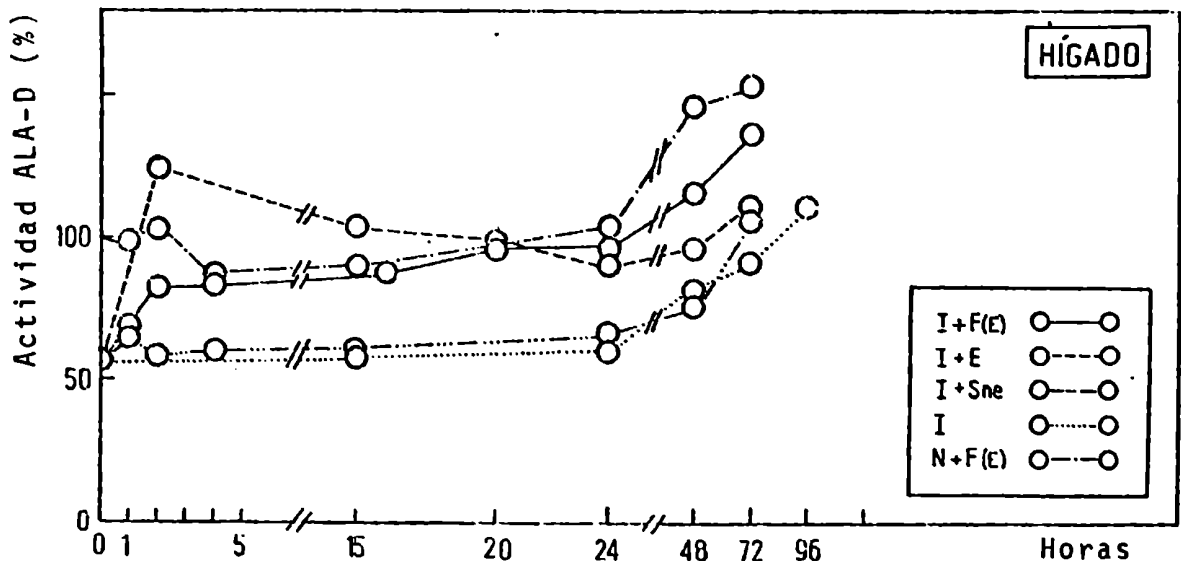


FIGURA 32: Comparación entre la respuesta del ALA-D hepática en los animales intoxicados sometidos a distintos tratamientos y en animales normales a los cuales se le administraron fantasmas cargados con enzima.
 I: animales intoxicados; N: animales normales;
 F(E): fantasmas de eritrocitos cargados con la enzima ALA-D; E: enzima libre; sne: sangre normal entera.

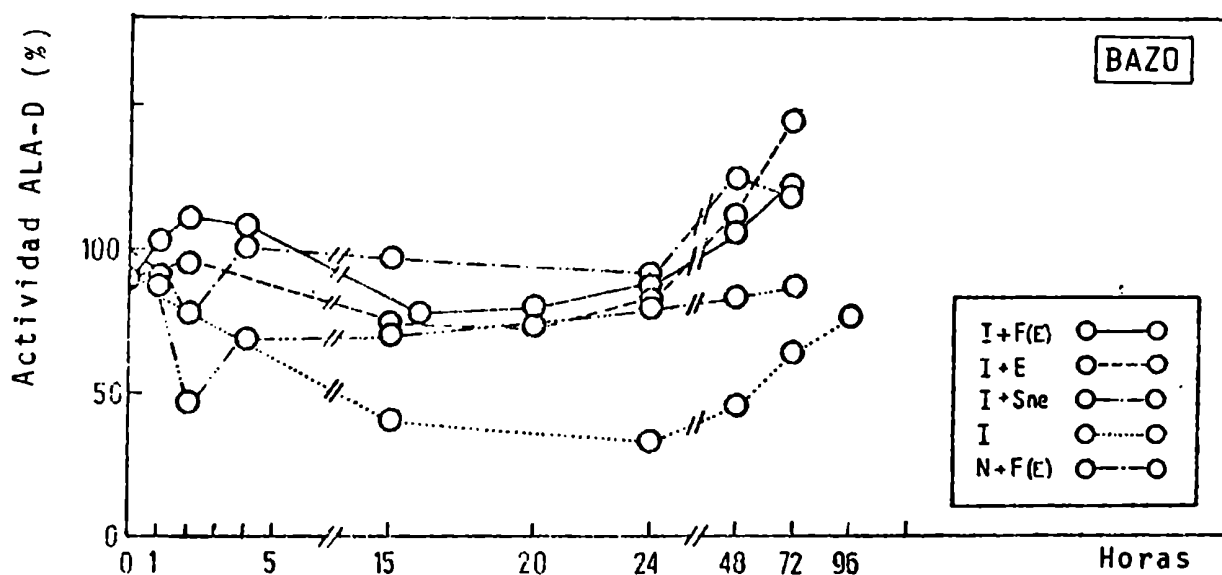


FIGURA 33: Comparación entre la respuesta del ALA-D de bazo en los animales intoxicados sometidos a distintos tratamientos y en animales normales a los cuales se le administraron fantasmas cargados con enzima. I: animales intoxicados; N: animales normales; F(E): fantasmas de eritrocitos cargados; E: enzima libre; sne: sangre normal entera.

Por último los cambios observados en el riñón (Figura 34), fueron los esperados, pues se trata de un tejido con muy reducida capacidad de captura de eritrocitos o sus fantasmas (Ihler, 1982).

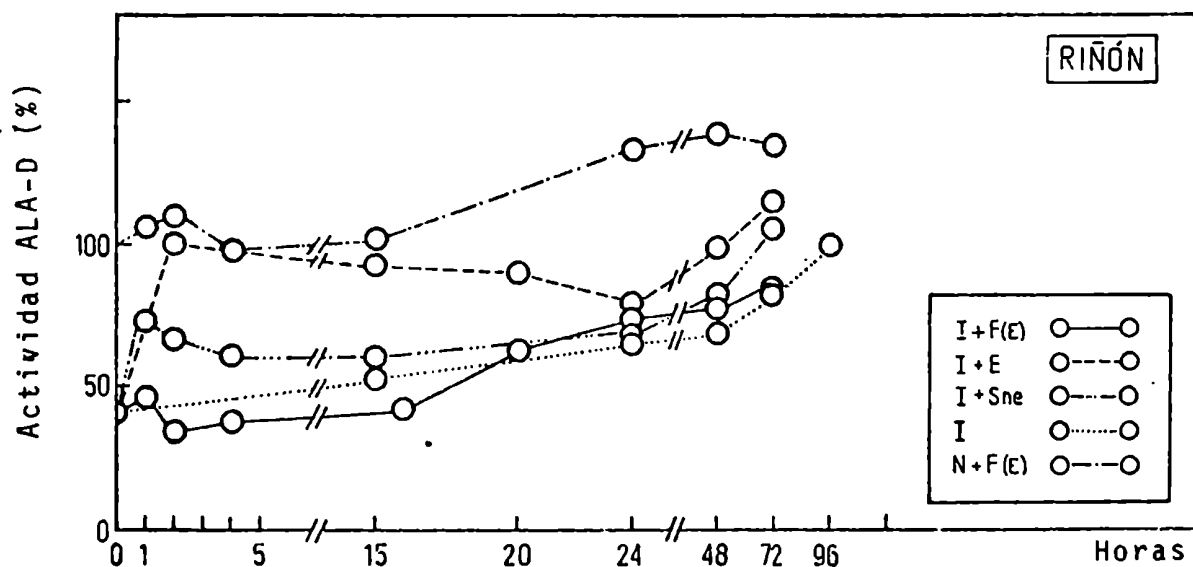


FIGURA 34: Comparación entre la respuesta del ALA-D de riñón en los animales intoxicados sometidos a distintos tratamientos y en animales normales a los cuales se le administraron fantasmas cargados con enzima.
 I: animales intoxicados; N: animales normales; F(E): fantasmas de eritrocitos cargados con la enzima ALA-D; E: enzima libre; sne: sangre normal entera.

II.B.2.1.7. Conclusiones

Los resultados obtenidos con el modelo animal, nos permiten afirmar que la administración del ALA-D encapsulada en fantasmas de eritrocitos autólogos o isólogos, es un tratamiento seguro, sin riesgos, que compensa el defecto enzimático en sangre de los animales intoxicados por plomo y que puede aplicarse también con éxito en casos humanos.

II.B.2.2. Paciente. Primera aplicación de la terapia por reemplazo enzimático en un caso humano de intoxicación crónica por plomo

II.B.2.2.1. Preparación de los fantasmas autólogos conteniendo el ALA-D

Mediante la técnica previamente desarrollada y descripta antes, a partir de 500 ml de sangre del mismo paciente se prepararon los fantasmas correspondientes conteniendo el ALA-D, purificada de 3 l de sangre normal. Se obtuvieron 100 ml de fantasmas, que se suspendieron en un volumen igual de solución salina (actividad 2,47 U/mg ó 128,4 U/ml), y se administraron al paciente por transfusión endovenosa a lo largo de 2 horas. Todo el proceso, realizado en condiciones estériles, desde la extracción de la sangre hasta su transfusión total llevó 10 horas.

II.B.2.2.2. Paciente. Observaciones clínico-bioquímicas

A.A., 43 años de edad, registro: 182.514. Hospital Gral. de Agudos J.M. Ramos Mejía.

Primera internación: Div. B.U. 4 C102; desde el 16/1/82 hasta el 1/2/82. Motivo de internación: cólico abdominal. Antecedentes personales: no alcoholismo, no drogas, bebedor de 8 a 12 pocillos de café por día, y fumador de 80 cigarrillos diarios, hábito que abandonó hace 9 años. No ha padecido enfermedades infecto contagiosas. Antecedentes laborales: contacto con diferentes formas de presentación del plomo desde los 20 años de edad. Antecedentes familiares: hijos con datos de laboratorio compatibles con cuadro de presaturismo (como se discute más adelante). Antecedentes de enfermedad actual: se inicia a los 29 años de edad después de haber trabajado varios meses en fundición de plomo, con cambios de carácter, síndrome depresivo, síntomas que duran 2 meses, seguidos por cuadro brusco de cefaleas, delirios, vómitos, ataxia, hipoacusia, alteraciones visuales y pérdida de la conciencia; requirió internación de urgencia en una clínica privada durante 20 días, período en el cual se efectuaron diversos estudios complementarios, que incluyen punción lumbar y arteriografías. Se le aplicó canalización y goteo de soluciones glucosadas varios días; sin tratamiento específico. Es dado de alta me-

jorado, sin diagnóstico. A los 35 años de edad (1974) presenta dolor precordial intenso, es internado durante 5 días; dándose de alta sin aparente compromiso orgánico, 2 días más tarde padece intenso dolor abdominal tipo cólico que motiva una intervención quirúrgica por aparente vólvulo intestinal a las 54 horas de la operación sufre nueva precordialgia diagnosticándose infarto de miocardio de cara diafragmática. Se prescribe reposo 40 días. Estuvo asintomático durante 6 años, cuando reaparece cuadro de cólicos abdominales subintrantes, con períodos de calma de 7 días, se acompaña de impotencia funcional de miembros inferiores y en agosto de 1981 comienza con impotencia sexual. Dada la persistencia de la sintomatología abdominal fue colesistectomizado en 1981. A pesar de ello continúan sus síntomas abdominales, por cuyo motivo es internado en el servicio del H.R. Mejía, en enero de 1982. Examen físico de ingreso: paciente moderadamente enfermo, hemodinámicamente compensado, TA 150/100, FC: 68/min, FR:16/min, afebril, peso: 85,500. Celular subcutáneo regular y universalmente aumentado, cicatrices: mediana supraumbilical, paramediana de recha, y en fosa ilíaca derecha (de apendicectomía); eventración mediana supraumbilical; mucosa bucal con "ribete de Burton". Aparato Respiratorio y Circulatorio; sin signos semiológicos patológicos. Abdomen: dolor difuso a la palpación superficial, con disminución a la palpación profunda. El resto del examen abdominal sin particularidades. Examen neurológico: abolición del reflejo patelar y aquileano bilateral. Estudios complementarios: 1) radiografía de tórax, cardiomegalia a expensas de ventrículo izquierdo, diafragmas aplanados, botón aórtico prominente, campos pulmonares libres. 2) ECG: ritmo sinusal, regular FC: 88; PR: 0,10; QRS: 0,12; eje de QRS: entre 0 y menos 30 grados; Q profunda en D2, D3 y AVF (no varía la inspiración profunda); S profundas en V6, R altas en V1; alteraciones de la repolarización. Conclusiones: secuela de infarto de miocardio de cara diafragmática, hipertrofia ventricular izquierda. 3) EMG; (3.2.82) se exploró deltoideos, cuádriceps extensores del antebrazo, velocidad de conducción: CPED: 35 m/seg, Med: derecha 40 m/seg revelándose ambas disminuidas, se vió compromiso neurógeno crónico sin actividad denervatoria actual. Diagnóstico: polineuropatía de tipo axónico neuronal, de grado moderado con buena compensación colateral. Análisis: Ht. 36%; Hb 12,2 g%; GB 6.800/mm³; glóbulos rojos con punteado basófilo; ESD 27 mm; uremia 0,38 g%; uricemia 7 mg% (N: 7 mg%) excreción de ácido úrico 620 mg% (N: 600), creatini-

na 1,1 mg%; quick 65%; KPTT 38 seg; orina: dens 1.027, pH ácido, cristales de ácido úrico. Hepatograma y proteinograma normales. Prueba de B.S.T. algo lenta pero dentro de límites normales.

Se sospecha una intoxicación plúmbica, lo cual se confirma en base: a la excreción urinaria aumentada de ALA y porfirinas, principalmente Coproporfirina, a la actividad significativamente reducida de ALA-D eritrocitaria y a los altos niveles de plomo en sangre (Tabla XII) (Enero 24, 1982).

Efectuando el diagnóstico de saturnismo se medica con dextrosa al 10% (10 a 20 mg/kg) por 2 horas, tratando de conseguir buena diuresis (350 a 500 ml/m²/24 h) y 1 gr de gluconato de calcio, es repetido en 2 oportunidades. El paciente fue dado de alta, asintomático, por su propia voluntad, organizando su internación para el tratamiento específico.

Segunda internación: desde el 20/2/82 hasta el 1/3/82. Paciente asintomático, sin dolor abdominal; continúa con impotencia sexual y polineuritis. Examen físico: sin cambios. Los datos bioquímicos en cuanto a la actividad enzimática y plúmbica señalan un ligero empeoramiento (Tabla XII) (15/2/82). Se realiza un tratamiento con quelantes: BAL: 3 mg/kg/dosis/IM cada 6 horas durante 2 días; luego cada 8 horas durante 4 días; y luego cada 12 horas durante 2 días; total 20 dosis. EDTA (cálcico-sódico): 30 mg/kg/día, en 500 ml de dextrosa al 5% EV, a pasar en 4 horas (42 gotas/min). Igual dosis durante 8 días.

A pesar del tratamiento, realizado sin complicaciones, no hubo cambios significativos en los niveles urinarios de precursores, plomo en sangre o en la actividad del ALA-D, como podemos ver los datos correspondientes al 5 y 26 de abril en la Tabla XII; inmediatamente de concluida la quelación, se dió de alta al paciente para su seguimiento por consultorio externo.

Aunque sabemos que la intoxicación con plomo es claramente un desorden adquirido en el metabolismo del hemo, de todas formas se realizó un estudio de algunos familiares consanguíneos del paciente, en el momento de su segunda internación (Tabla XIII). Es interesante observar que, aquellos miembros de su familia, como su esposa y sus tres hijos, que vivían bajo el mismo techo, si bien no mostraban ningún signo clínico, tenían niveles bajos de ALA-D, en particular los dos hijos varones (casos 3 y 5) que habían estado ayudando al paciente en sus trabajos de plomería,

TABLA XII: Datos de laboratorio del paciente

Fecha	Orina		Porfirinas urinarias			Porfirinas fecales	ALA-D	Pb
	ALA	PBG	μg/24 h					
	mg/24 h	mg/24 h	URO	COPRO	Total	μg/g seco	U/ml PBG	μg %
25/1/82	19,98	4,26	196,8	1740,6	1937,4	112,2	44	71
15/2/82	9,76	3,27	197,2	822,4	1019,6	117,9	27	105
05/4/82	8,65	2,27	130,1	622,6	752,8	66,3	58	123
26/4/82	9,41	2,99	23,9	306,2	330,1	340,2	83	125
normales	2-4	1-2	-	-	20-250	30-130	656±126	0-35

Las determinaciones se llevaron a cabo según se describe en Métodos

TABLA XIII: Datos de laboratorio del paciente y familiares

Caso	Sexo	Edad	Orina		Porfirinas urinarias			Porfirinas fecales	ALA-D	Pb
			ALA	PBG	µg/24 h					
			mg/24 h	mg/24 h	URO	COPRO	Total	µg/g		
1 A.A.C. propósito	M	43	9,76	3,27	197	822,0	1019,0	118	27	105
2 A.V. esposa	F	39	1,69	1,74	-	24,1	24,1	344	376	29
3 A.N. hijo	M	16	3,94	3,22	48	190,8	238,8	194	66	55
4 A.Gr. hija	F	15	2,43	4,19	-	26,1	26,1	119	430	39
5 A.G. hijo	F	12	0,89	2,67	-	29,9	29,9	245	194	27
6 A.A. hermana	F	40	1,00	0,80	-	12,2	12,2	73	735	10
7 A.M. hermana	F	38	1,10	0,60	-	34,5	34,5	58	888	8

Estas determinaciones se llevaron a cabo el 15 de febrero de 1982, en el momento de la segunda internación del paciente en el Hospital Ramos Mejía

el hijo mayor también presenta niveles de plomo superiores a los normales y una excreción urinaria de precursores por arriba del límite control. Por otra parte, dos hermanas del paciente (casos 6 y 7) que viven en otro domicilio, son completamente normales.

II.B.2.2.3. Aplicación de la terapia por reemplazo enzimático

En este paciente el tratamiento con quelantes no produjo ningún beneficio, ni clínico ni bioquímico. A comienzos de diciembre de 1982, por presentar nuevos episodios de cólicos, sin mediar exposición al plomo y dado que los datos de laboratorio eran prácticamente los mismos que los obtenidos en los últimos estudios previos, se hizo una tercera internación (3.12.82 al 17.12.82) y se decidió aplicar la terapia por reemplazo enzimático, empleando fantasmas de glóbulos rojos autólogos cargados con ALA-D.

Como se señalara, a pesar de varios intentos, hasta el momento, no se había logrado ningún resultado práctico con la aplicación de la terapia enzimática en alguna enfermedad humana. Sin embargo, se consideró que en este caso se daban todas las condiciones para que el tratamiento fuera un éxito. En base a nuestros exhaustivos estudios previos, tanto *in vitro*, como en los modelos animales *in vivo*, se demostró que la administración del ALA-D encapsulada en fantasmas de eritrocitos, a animales *in* toxicados con plomo, era absolutamente segura, sin riesgos y podía compensar el defecto bioquímico, restaurando la actividad del ALA-D, significativamente reducida, a niveles normales.

Se informó cuidadosamente al paciente acerca del nuevo tratamiento, luego de lo cual éste dio su total consentimiento.

El 6 de diciembre, se trató el paciente con 100 ml de fantasmas de eritrocitos autólogos cargados con 25.600 unidades de ALA-D. Se lo controló permanentemente durante las primeras 24 horas; la transfusión de la enzima no produjo ningún efecto sobre la presión sanguínea, el ritmo de la respiración, pulso, temperatura y otros signos vitales, (FC: 70, FR: 16, TA: 150/95, Tax: 36,8), (diuresis horaria conservada). Tampoco se observaron anomalías en las funciones renal o hepática ni hubo ningún otro síntoma subjetivo asociado con la administración de la enzima en esta forma. Se tomaron seis muestras de sangre y orina a

lo largo de las primeras 24 horas, luego una diariamente hasta los 11 días y a continuación cada tres o cuatro días. En la Figura 35 se muestran los datos obtenidos. Se apreció un significativo aumento en la actividad del ALA-D a la hora, con un pico a las 2 horas seguido de un descenso de 7-10% a las 4 horas y luego una recuperación constante a las 16, 24 horas, alcanzando un segundo máximo después de 2 días de la transfusión, estos niveles se mantuvieron alrededor de una semana, al día 10 comenzó a disminuir ligeramente hasta el día 14 para finalmente estabilizarse en ese valor. El paciente continúa siendo controlado periódicamente, a fin de seguir su evolución clínica y bioquímica a largo plazo.

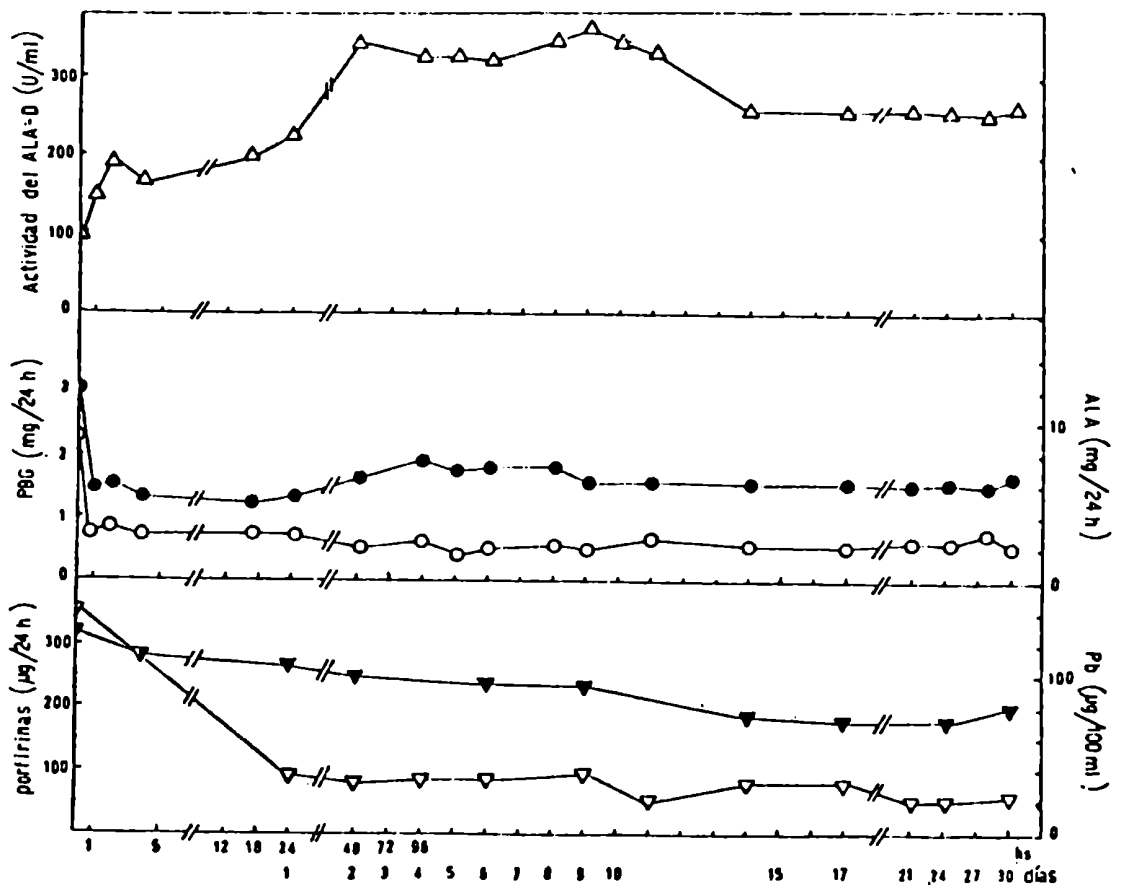


FIGURA 35: Efecto de la terapia por reemplazo enzimático, empleando fantasmas de eritrocitos autólogos cargados con ALA-D, administrados a un paciente con intoxicación plúmbica crónica sobre: los niveles de ALA-D (Δ), ALA urinario (\circ), PBG urinario (r), porfirinas urinarias (∇) y Pb en sangre (\blacktriangledown). El paciente recibió una única dosis de enzima al tiempo 0. Los demás detalles experimentales se dan en el texto.

Es importante notar aquí, que la respuesta del paciente fue bastante semejante a la observada con los animales, es llamativo el primer pico de las 2 horas, y luego de un descenso, la nueva recuperación hasta lograr estabilizarse a un determinado nivel que sabemos depende de la dosis de enzima suministrada.

Además, se encontró que la excreción urinaria de precursores y porfirinas se normalizó rápidamente en tanto que la concentración de plomo en sangre se redujo un 45% (Figura 35).

Aunque a menudo es difícil valorar los cambios subjetivos, podemos decir que durante el tratamiento se observó una rápida mejoría en el estado general y anímico del paciente. No se detectó ningún efecto colateral indeseado, así como tampoco ninguna anormalidad en el sistema de coagulación o en la función hepática durante o después de la transfusión. Desaparecieron todos los síntomas, en tanto que los parámetros clínicos y bioquímicos se normalizaron.

Es interesante comentar que ya desde su primera internación en el Ramos Mejía, el paciente se había quejado de impotencia sexual; después del tratamiento con fantasmas cargados con ALA-D, el paciente confesó haber recuperado totalmente su capacidad sexual. Se sabe que la exposición a muy bajas dosis de plomo ($2 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal) produce daños en la espermatogénesis y a la altura de la síntesis de RNA durante la fase de división celular (Erogova y col, 1966), también se han observado problemas androgénicos asociados a una disfunción sexual en hombres expuestos a gasolina conteniendo antidetonantes a base de plomo (Neshkov, 1971) o a plomo inorgánico (Lancranjean y col, 1975). Por otra parte recordemos que la eliminación de ciertos metales polivalentes incluyendo el plomo, por medio de la quelación, aumenta drásticamente la vida media del espermatozoide (Bjorksten, 1968).

La recuperación de la función sexual en nuestro paciente, es otro signo claro y evidente del efecto beneficioso producido por la terapia empleada. Podríamos todavía especular, suponiendo que la carga de ALA-D administrada en los fantasmas de eritrocitos, no sólo se empleó para metabolizar el exceso de ALA y restaurar la actividad del ALA-D a niveles cercanos a los normales, sino que también es posible que parte de la enzima exógena haya estado actuando como una especie de quelante, secuestrando una fracción del plomo circulante.

También pensamos que es muy probable que la administración de una cantidad mayor de enzima podría haber sido aún más efectiva, de manera que los efectos hubieran sido todavía más intensos que los observados en el caso de este paciente, disminuyendo por ejemplo bastante más los niveles de plomo en sangre.

CONCLUSIONES FINALES

II.C. CONCLUSIONES FINALES

Se había establecido que la terapia por reemplazo enzimático era un prometedor enfoque terapéutico, sin embargo aún no se había logrado ningún resultado positivo (Beutler, 1981).

Los fantasmas de eritrocitos poseen muchos de los atributos de un carrier ideal para enzimas (Ihler, 1979) y uno de los más importantes es que se puede usar la misma sangre del paciente. Sin embargo hasta este trabajo, el único intento anterior de su aplicación en un caso humano había sido en un ensayo infructuoso para tratar la enfermedad de Gaucher mediante la administración de glucocerebrosidasa encapsulada en glóbulos rojos del mismo paciente (Beutler y col, 1977a). En ese interesante trabajo, aunque los resultados obtenidos fueron de dudoso beneficio, el caso de una paciente con la enfermedad en estado muy avanzado, que finalmente murió; los autores demostraron sin embargo, que la aplicación de esta terapia no era riesgosa.

Los resultados de nuestros extensos estudios previos en modelos animales, fueron indudablemente muy estimulantes y nos impulsaron, con la seguridad de lograr un efecto positivo, a iniciar el tratamiento por reemplazo enzimático en un caso de intoxicación crónica por plomo por cuanto únicamente en una prueba clínica se puede evaluar la eficiencia clínica de cualquier terapia.

En consecuencia, según nuestros conocimientos, esta es la primera vez que se aplica con éxito en la clínica humana, el uso de una enzima encapsulada en fantasmas de eritrocitos para el tratamiento de una enfermedad.

En el presente estudio se han empleado glóbulos rojos autólogos, pero también podrían utilizarse células de un donador del mismo grupo sanguíneo.

Hasta el momento la intoxicación por plomo se trata generalmente con agentes quelantes, tales como el BAL, EDTA o penicilamina que con frecuencia producen efectos colaterales indeseados, por lo cual debe realizarse un cuidadoso control para evitar una posible toxicidad de la medicación. El tratamiento que hemos desarrollado y estamos proponiendo, está prácticamente libre de efectos colaterales.

De estos resultados surge además, que un gran número de pacientes intoxicados por plomo podrían beneficiarse con esta nueva forma de terapia.

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, overlapping strokes that form a stylized, somewhat abstract shape.A handwritten signature in black ink, featuring a prominent vertical stroke on the left and a series of sweeping, curved lines that extend to the right, ending in a small loop.

REFERENCIAS

- Affinity Chromatography (1979) Principles & Methods, Pharmacia Fine Chemicals, p. 20.
- Anderson, P.M. & Desnick, R.J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6924.
- Batlle, A.M. del C. (1968) Resultados no publicados.
- Beutler, E. (1981) Trends in Biochem. Sci. 6, 95
- Beutler, E.; Dale, G.L.; Guinto, E. & Kuhl, W. (1977 a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4620.
- Beutler, E.; Dale, G.L. & Kiehl, W. (1977 b) N. Engl. J. Med. 296, 942.
- Beutler, E.; Dale, G.L. & Kiehl, W. (1980) en "Enzyme Therapy in Genetic Diseases" 2, 369. Ed. Desnick, R.J. ; New York: Alan R.Liss, Inc.
- Bjorksten, J. (1968) J. Am. Geriatr. Soc. 16, 408.
- Brady, R.O.; Pentchev, P.G.; Gal, A.E.; Hibbert, S.R. & Debakan, A.S. (1974) New Engl. J. Med. 291, 989.
- Erogoval, G.M.; Ivanov, M.G. & Sanotskij, I.V. (1966) In Toksikologiya Novykh Promyshlennykh Khimicheskikh Veshchestv Letavet, A.A., Sanotskij, I.V. (eds) Moscow: Meditsena Vol III, p. 33.
- Green, R.; Lamon, J. & Curran, D. (1980) The Lancet Aug 16, 327.
- Ham, D. (1967) En "Methods of Carbohydrates Chemistry" N.K. Kochetkov. Ed. Mir. Moscow p. 478.
- Ihler, G.M. (1979) en " Drugs Carriers in Biology and Medicine" Ed. Gregoriadis, G. Academic Press. Inc. London, N.Y. S. Fco, p. 129.
- Ihler, G.M. (1982) En " Gaucher Disease: A Century of Delineation and Research", 655. New York: Alan R. Liss, Inc.
- Ihler, G.M.; Glew, R.H. & Schnure, F.W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2663.
- Lancranjean, I.; Popescu, H.; Gavanescu, O.; Klepsch, J. & Serbanescu, M. (1975) Arch. Environ. Health 30, 396.
- Neshkov, N.S. (1971) Gig. Tr. Prof. Labor. 15, 45.

- Polo, C.F.; Stafforini, D.M. Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) En preparación.
- Rechsteiner, M. (1978) Natl. Cancer Inst. Monograph 48, 57.
- Rifkind, R.A. (1966) Amer. J. Med. 41, 711.
- Seeman, P. (1967) J. Cell Biol. 32, 55.
- Stella, A.M. (1977) Tesis doctoral (UBA).
- Stella, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1977) Int. J. Biochem. 8, 353.
- Stella, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1978) Plant Sci. Lett. II (2), 87.
- Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1977) Mol. Cell Biochem. 16, 97.
- Wn W.H., Shemin, D.; Richards, R.E. & Williams, R.C. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1767.