

## Tesis de Posgrado

# Investigación de los niveles de enzimas relacionadas con la biosíntesis de tetrapirroles en modelos vegetales y en individuos normales y porfíricos

Vázquez, Elba Susana

1984

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

#### Cita tipo APA:

Vázquez, Elba Susana. (1984). Investigación de los niveles de enzimas relacionadas con la biosíntesis de tetrapirroles en modelos vegetales y en individuos normales y porfíricos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1873\\_Vazquez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1873_Vazquez.pdf)

#### Cita tipo Chicago:

Vázquez, Elba Susana. "Investigación de los niveles de enzimas relacionadas con la biosíntesis de tetrapirroles en modelos vegetales y en individuos normales y porfíricos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1984.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1873\\_Vazquez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1873_Vazquez.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**INVESTIGACION DE LOS NIVELES DE ENZIMAS  
RELACIONADAS CON LA BIOSINTESIS DE  
TETRAPIRROLES EN MODELOS VEGETALES Y  
EN INDIVIDUOS NORMALES Y PORFIRICOS**

**ELBA SUSANA VAZQUEZ**



**TESIS 1984**

INVESTIGACION DE LOS NIVELES DE ENZIMAS RELACIONADAS  
CON LA BIOSÍNTESIS DE TETRAPIRROLES EN MODELOS  
VEGETALES Y EN INDIVIDUOS NORMALES Y PORFIRICOS

por

ELBA SUSANA VAZQUEZ

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

DIRECTOR: Dra. Eva Adela Wider

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)

1 9 8 4

1873 -  
ej. 2

*a Ricardo*  
*a Florencia*  
*a mis padres*

## INDICE GENERAL

---

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
ABREVIATURAS	ii
INTRODUCCION	1
- CAPITULO I: TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS	1
I.1.  Generalidades	1
I.2.  Precusores: ALA y PBG	1
I.3.  Tetrapirroles: Estructura y propiedades	2
I.4.  Distribución de los tetrapirroles	14
Referencias	20
- CAPITULO II: BIOQUIMICA DE LOS TETRAPIRROLES	22
II.1.  Introducción	22
II.2.  Glicocola, acetato y succinil-CoA como pre- cursores del hemo	22
II.3.  Enzimas del camino de los tetrapirroles	23
Referencias	44
- CAPITULO III: REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS	50
III.1.  Manifestaciones de los mecanismos de regu- lación	50
III.2.  Mecanismos de control	51
Referencias	69

	Página
- CAPITULO IV: ACIDO $\delta$ -AMINOLEVULICO SINTETASA	72
IV.1.  Introducción	72
IV.2.  Distribución biológica	72
IV.3.  Propiedades catalíticas	74
IV.4.  Propiedades proteicas	81
IV.5.  Mecanismo de reacción	84
IV.6.  Inducción	92
Referencias	96
- CAPITULO V: RODENASA	102
V.1.  Introducción	102
V.2.  Distribución biológica	103
V.3.  Propiedades catalíticas	108
V.4.  Propiedades proteicas	119
V.5.  Mecanismo de acción	128
V.6.  Funciones biológicas	142
Referencias	164
- CAPITULO VI: PORFIRIAS	173
VI.1.  Generalidades	173
VI.2.  Clasificación de las porfirias	173
Referencias	201
- CAPITULO VII: SISTEMAS ENZIMATICOS EMPLEADOS	209
VII.1.  Callos de soya	209
VII.2.  Bacterias fotosintéticas	212
VII.3.  Matrices artificiales en el estudio de reacciones bioquímicas	216
Referencias	222

	Página
MATERIALES Y METODOS	223
- CAPITULO I: MATERIALES Y METODOS	223
I.1. Equipos utilizados	223
I.2. Reactivos	223
I.3. Fuentes enzimáticas	223
I.4. Enzimas utilizadas. Preparación	230
I.5. Determinación de actividades enzimáticas	231
I.6. Unidades enzimáticas	237
I.7. Determinación de la concentración proteica	237
I.8. Determinación de azufre lábil	238
I.9. Determinación de pesos moleculares	238
I.10. Inmovilización de rodenasa	239
Referencias	241
RESULTADOS Y DISCUSION	243
- CAPITULO I: RODENASA DE CULTIVOS DE CALLOS DE SOYA	243
I.1. Generalidades	243
I.2. Condiciones óptimas para la determinación de la actividad de rodenasa	243
I.3. Biosíntesis de porfirinas en cultivos de callos de soya	248
I.4. Conclusiones	252
Referencias	254
- CAPITULO II: RODENASA DE <i>Rp. palustris</i>	255
II.1. Condiciones óptimas de extracción de la proteína enzimática	255
II.2. Actividad de rodenasa en distintas fracciones	258
II.3. Purificación	260
II.4. Determinación del peso molecular	268
II.5. Inmovilización de rodenasa sobre gel de Sepharosa 4B	269

	Página
II.6. Estudio comparativo de las propiedades de la enzima soluble e inmovilizada	273
II.7. Estudios cinéticos	278
II.8. Mecanismo químico de la rodenasa	290
II.9. Interacción de la rodenasa con distintas enzimas	300
II.10. Conclusiones	316
Referencias	318
- CAPITULO III: RODENASA DE ERITROCITOS HUMANOS	319
III.1. Determinación de las condiciones óptimas para la medición de rodenasa en sangre	319
III.2. Actividad de rodenasa y ALA-S en eritrocitos de individuos normales y porfíricos	323
III.3. Estudio comparativo de rodenasa aislada de eritrocitos de individuos normales y porfíricos	330
III.4. Estudio comparativo de las propiedades de rodenasa purificada de GRHN y GRHPAI	337
III.5. Conclusiones	345
Referencias	346



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a la Dra. Eva Wider quien ha dirigido esta Tesis brindándome su apoyo y estímulo. Deseo también manifestar mi reconocimiento a la Dra. Alcira Batlle que en todo momento me ha orientado en el desarrollo del trabajo con su experiencia y conocimiento.

Agradezco a la Dra. Norma Bustos por la realización de los dibujos y sobre todo por su amistad.

A la Lic. Ana María Buzaleh por la dedicación puesta al transcribir el manuscrito y fundamentalmente, por su valiosa colaboración en la realización de las experiencias presentadas.

A los Lic. Susana Afonso y César Polo por su esmero en la corrección de los originales.

Al Dr. Luis Espínola y al Lic. Sergio Paredes por su ayuda en las técnicas con animales.

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

Al CONICET por las Becas concedidas.

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

Y muy especialmente, a todos los integrantes del CIPYP quienes han hecho posible la concreción de este trabajo con su aliento y compañerismo.

## ABREVIATURAS

Suc. CoA	Succinil Coenzima A
DOVA	$\gamma$ - $\delta$ -dioxovalerato
ALA	Acido $\delta$ -aminolevúlico
PBG	Porfobilinógeno
Uro, urogen	Uroporfirina, uroporfirinógeno
Firia, firiagen	Firiaporfirina, firiaporfirinógeno
Copro, coprogen	Coproporfirina, coproporfirinógeno
Proto, protogen	Protoporfirina, protoporfirinógeno
Suc. CoA-S	Succinil-CoA-sintetasa
DOVA-T	DOVA-transaminasa
ALA-S	ALA-sintetasa
ALA-D	ALA-dehidrasa
PBGasa	Porfobilinogenasa
CPGasa	Coprogenasa
PCE	Porfiria congénita eritropoyética
PPE	Protoporfiria eritropoyética
CPE	Coproporfiria eritropoyética
PCT	Porfiria cutánea tardía
PAI	Porfiria aguda intermitente
PV	Porfiria variegata
CPH	Coproporfiria hereditaria
AIA	2-alil-2-isopropilacetamida
CySH	Cisteína
CySSCy	Cistina
CySSSCy	Trisulfocistina
DDC	3,5-dicarbetoxi-dihidrocolidina
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
SDS	Dodecil sulfato de sodio

PyP	Fosfato de piridoxal
GSH	Glutati3n
TCA	Acido tricloroac3tico
TRIS	TRI(hidroxi metil) aminometano
GR	Gl3bulos rojos
GRHN	Gl3bulos rojos de individuos normales
GRHPAI	Gl3bulos rojos de individuos con PAI
GRHPCT	Gl3bulos rojos de individuos con PCT

# **INTRODUCCION**

## CAPITULO I

### TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS

---

	Página
I.1. Generalidades	1
I.2. Precursores: ALA y PBG	1
I.3. Tetrapirroles: Estructura y propiedades	2
I.3.1. Porfirinas	4
I.3.1.1. Formas isoméricas	4
I.3.2. Porfirinógenos	4
I.3.3. Metaloporfirinas	6
I.3.3.1. Complejos hierro-porfirina	8
I.3.3.2. Complejos magnesio-porfirina	10
I.3.3.3. Vitamina B <sub>12</sub>	11
I.3.4. Tetrapirroles de cadena abierta	12
I.4. Distribución de los tetrapirroles	14
I.4.1. Hemoproteínas	15
I.4.1.1. Hemoglobina	15
I.4.1.2. Mioglobina	16
I.4.1.3. Citocromos	17
I.4.1.4. Peroxidasas	18
I.4.1.5. Catalasas	18
I.4.1.6. Triptofano-pirrolasa	19
Referencias	20

## I. TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS

### I.1. GENERALIDADES

La estructura tetrapirrónica es una de las bases primordiales para la supervivencia en la mayoría de los sistemas biológicos de nuestro planeta.

Es la responsable del color rojo de la hemoglobina y del verde de la clorofila, los dos pigmentos más importantes de la materia viviente, involucrados en los procesos fundamentales de la respiración y la fotosíntesis.

La importancia de los tetrapirroles en la naturaleza y el hecho de que en la mayoría de los sistemas biológicos no fuesen requeridos como factores de crecimiento, indicaban que la síntesis de los mismos provenía de precursores simples (Lascelles, 1964). En las últimas décadas se demostró, en un gran número de organismos uni y multicelulares, que los primeros integrantes de la vía porfirínica son la glicina y la succinil-CoA, a partir de los cuales se forma el primer precursor específico de este camino, el ácido  $\delta$ -aminolevúlico (ALA). El monopirrol porfobilinógeno (PBG) surge de la condensación de dos moléculas de ALA. La ciclación de cuatro moléculas de PBG da origen a las porfirinas.

### I.2. PRECURSORES: ALA Y PBG

En 1931, Sachs encontró que la orina de pacientes con porfiria aguda intermitente contenía altas concentraciones de un compuesto que daba reacción de Ehrlich positiva; éste fue denominado porfobilinógeno (PBG) (Figura I.1.) (Waldenström y Wahlquist, 1939). Después de varios intentos para aislarlo, recién en 1953 Cookson y Rimington consiguieron separarlo y determinar su estructura, confirmada luego por síntesis (Rimington y Kroi, 1955). Se comprobó que el PBG se convertía en uro, copro y protoporfirina, indicando que era el precursor normal de los tetrapirroles en los seres vivos (Bogorad y Granick, 1953; Falk y col, 1953).

Una vez conocida la estructura del PBG, demostrado que podía formarse a partir de glicocola y succinato, y que era un intermediario en la biosíntesis de porfirinas fue posible espe-

cular acerca de las etapas existentes entre estos compuestos. Así se postuló que, por condensación de glicocola con succinil CoA, se formaba un compuesto inestable, el ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -cetoadípico, que fácilmente se decarboxilaba a ALA (Figura I.1.) constituyendo esta molécula el verdadero precursor. Esta hipótesis se confirmó experimentalmente (Dresel y Falk, 1953; Neuberger y Scott, 1953).

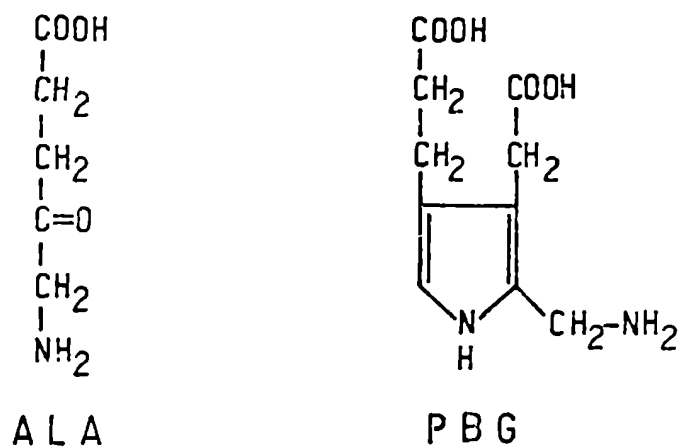


FIGURA I.1.: Estructuras del ácido  $\delta$ -aminolevúlico (ALA) y del porfobilinógeno (PBG)

Shemin (1954) demostró que las porfirinas no son los únicos productos metabólicos del ALA. A partir de este compuesto se puede formar también, por deaminación oxidativa el ácido  $\gamma, \delta$ -dioxovalérico ( $\alpha$ -cetoglutarato semialdehído) (DOVA), el cual vía  $\alpha$ -cetoglutarato y succinato puede entrar al ciclo del ácido cítrico y a través de los  $C_1$  contribuir a la síntesis de purinas. Básicamente, el ciclo propuesto por Shemin, conocido por su nombre, es un camino de degradación de la glicina que propone vías metabólicas alternativas para disponer del exceso de ALA que no se utiliza para la síntesis del hemo.

### I.3. TETRAPIRROLES: ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Los tetrapirroles son compuestos derivados de la molécula

la de porfina (Figura I.2.), que contiene cuatro anillos pirr6-  
licos (A, B, C y D) unidos entre s3 por cuatro puentes metenos  
( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ).

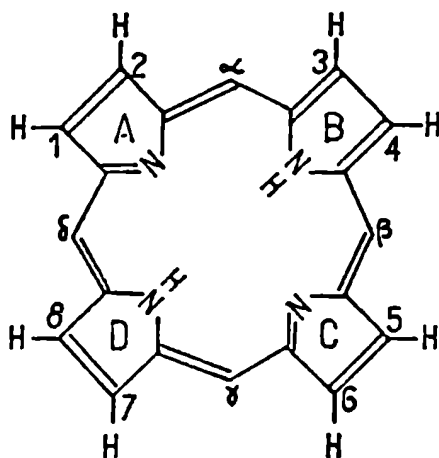


FIGURA I.2.: Porfina

El macrociclo de la porfina con sus dobles ligaduras o  
rigena una estructura resonante, muy estable y planar.

La forma m3s estable de la porfina es aquella en la cual  
las uniones entre hidr6genos y nitr6genos son m3s cortas que las  
uniones puente de hidr6geno (Badger y col, 1962). La estructura  
menos sim6trica, con los hidr6genos unidos a 3tomos de nitr6geno  
vecinos, presenta menor estabilidad debido a la penetraci6n de  
cada hidr6geno en la esfera de las fuerzas de van der Waals de  
los otros (Mason, 1958; Corwin y col, 1962).

Las estructuras de los distintos tetrapirroles encontra-  
dos en la naturaleza derivan de la porfina seg6n varias modifica-  
ciones:

- 1) Por sustituci6n de los 3tomos de carbono externos (1-8) de  
los anillos pirr6licos; el sustituyente puede ser un grupo al-  
quilo, o un 3tomo de hidr6geno y un grupo alquilo como en los  
clorofilas.
- 2) Por inserci6n de un metal originando metaloporfirinas.
- 3) Por sustituci6n o reemplazo de los carbonos de los puentes me-  
teno. Los sustituyentes pueden ser 3tomos de hidr6geno como  
en los porfirin6genos, o un anillo ciclopentanona como en las



clorofilas. En el caso del anillo porfirínico de la corrina, típico de los derivados de la vitamina B<sub>12</sub>, se ha perdido el puente meténico δ.

### I.3.1. Porfirinas

Las porfirinas son tetrapirroles libres de metales, que se diferencian estructuralmente según la naturaleza y el ordenamiento de las cadenas laterales que han sustituido las posiciones 1 a 8 de los anillos pirrólicos.

Las porfirinas y sus derivados son intensamente coloreados y a sus principales bandas de absorción corresponden altos coeficientes de extinción molar (del orden de  $2 \cdot 10^5$ ).

#### I.3.1.1. Formas isoméricas

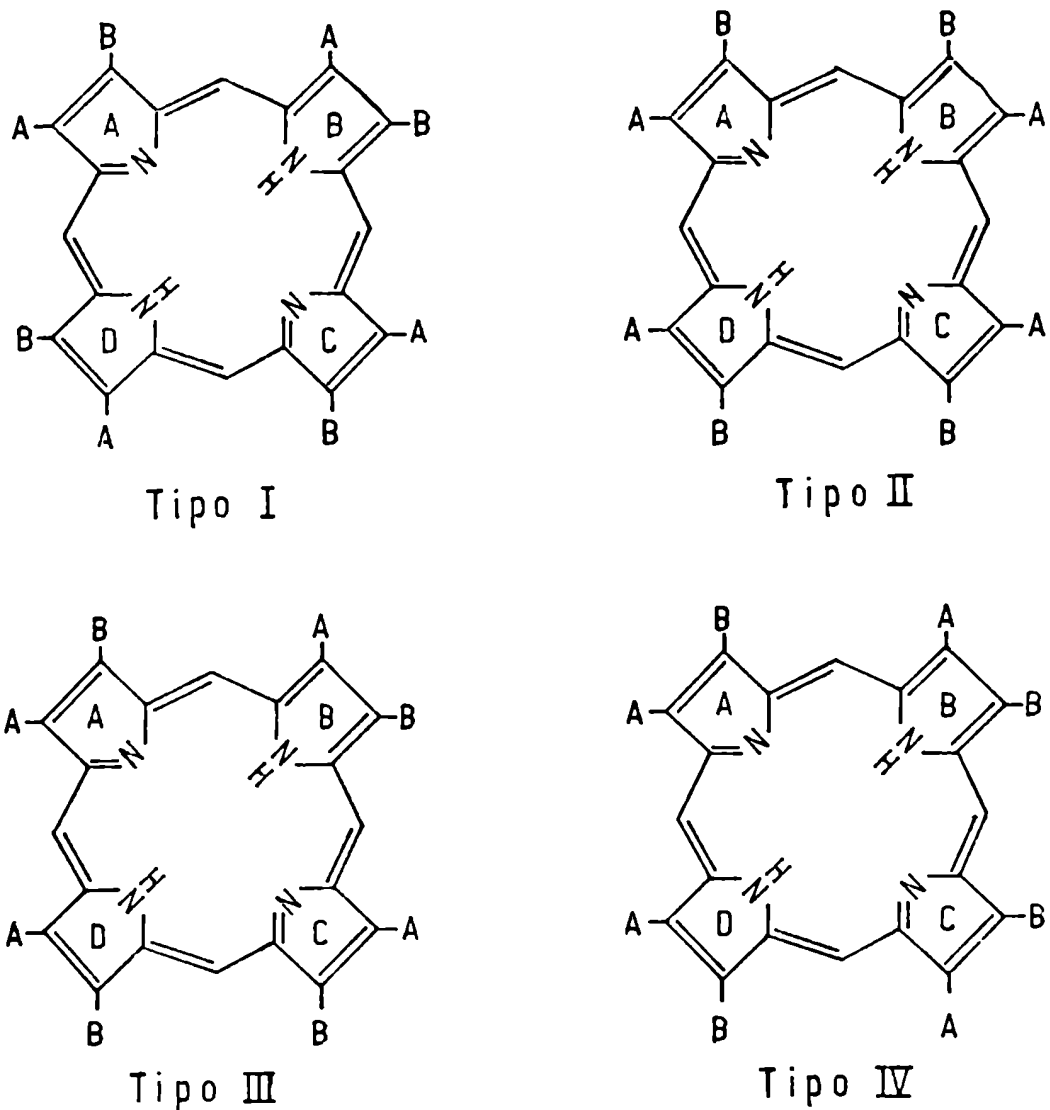
Fischer y Orth (1937) señalaron que una porfirina con sólo dos tipos distintos de sustituyentes, presenta cuatro posibles isómeros de posición (Tipo I, II, III, IV) (Figura I.3.).

Cuando existen tres grupos sustituyentes diferentes, como en la protoporfirina, se pueden formar quince isómeros de posición. La protoporfirina IX (Figura I.4.) está relacionada con la etioporfirina III, y también con la uroporfirina III y coproporfirina III, y sus respectivos porfirinógenos que son los precursores biosintéticos de la protoporfirina IX.

Cada porfirina y metaloporfirina con función metabólica es modelada sobre este patrón general de sustitución en la cadena lateral, incluyendo los grupos prostéticos de todas las hemoproteínas conocidas, las clorofilas y vitamina B<sub>12</sub>. Todos los tetrapirroles fisiológicamente activos pertenecen a la serie isomérica III. La uroporfirina I y coproporfirina I se forman sólo en condiciones patológicas.

### I.3.2. Porfirinógenos

Los porfirinógenos son hexahidroporfirinas en las cuales los cuatro átomos de carbono de los puentes meteno y los dos átomos de nitrógeno pirrolénicos están hidrogenados.



**FIGURA I.3.:** Representación esquemática de los isómeros de las uro, copro y etioporfirinas.  
 Uroporfirina: A =  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$  B =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$   
 Coproporfirina: A =  $-\text{CH}_3$  B =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$   
 Etioporfirina: A =  $-\text{CH}_3$  B =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$

Los porfirinógenos correspondientes a meso, uro y otras porfirinas se han preparado en forma cristalina e identificado (Whalley, 1955). Los porfirinógenos no son planos, no tienen color ni fluorescen debido a que la conjugación del macrociclo de la porfirina está destruida. El uroporfirinógeno puede obtenerse por reducción química de la uroporfirina y también se forma por condensación química (Rimington, 1955) o enzimática (Mauze-rall y Granick, 1958) de cuatro moléculas de PBG.

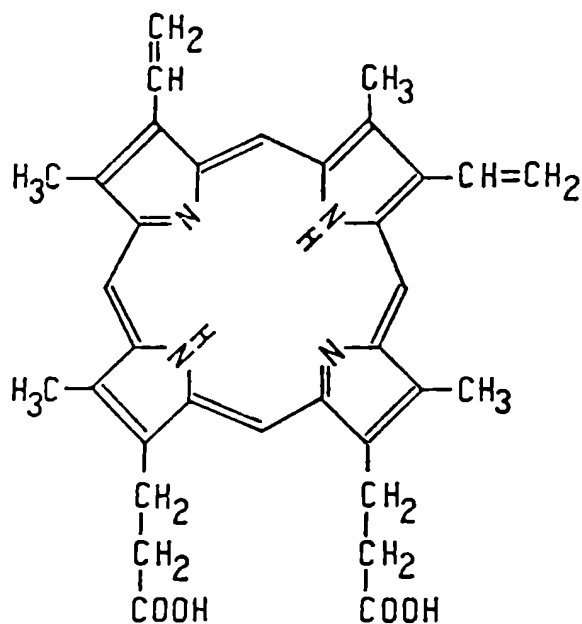


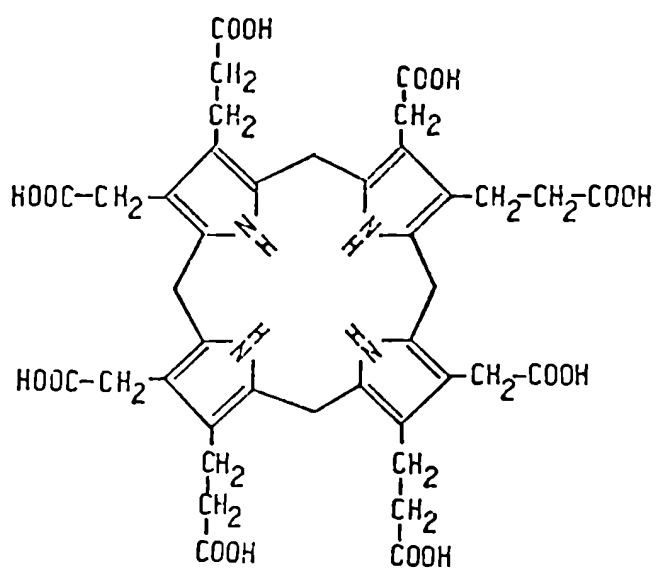
FIGURA I.4.: Protoporfirina IX

El 50% de las porfirinas totales en la orina humana normal se excreta en forma de porfirinógenos (Watson y col, 1951). Como ya se señaló, uro, copro y proto-porfirinógenos (Figura I.5) son los intermediarios fisiológicos en la biosíntesis de la protoporfirina IX (Figura I.4.). Las correspondientes porfirinas (Figura I.5.) encontradas en la naturaleza se producen por oxidación de estos intermediarios reducidos. Se ha demostrado que en el caso del protoporfirinógeno, dicha oxidación es enzimática (Sano y Granick, 1961). También se han hallado evidencias experimentales que indican que la protoporfirina es el precursor del hemo (Porra y Jones, 1963).

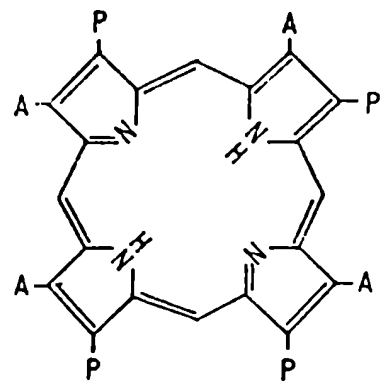
### I.3.3. Metaloporfirinas

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

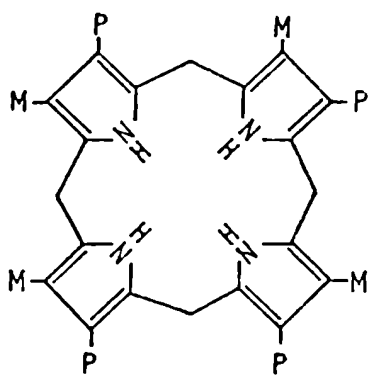
La combinación con metales ocurre tanto con las porfirinas libres como con las esterificadas y los complejos metálicos son solubles en solventes orgánicos. Estas propiedades indican que los metales están formando un complejo con la porfirina y no son sales de las mismas.



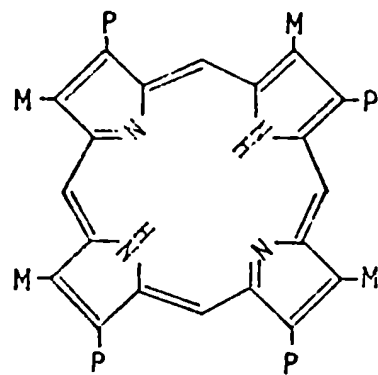
Uroporphirinógeno III



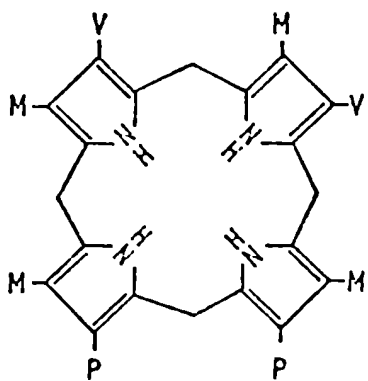
Uroporfirina III



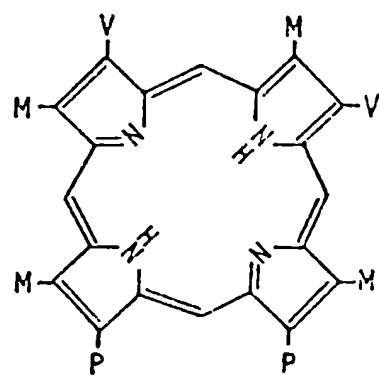
Coproporfirinógeno III



Coproporfirina III



Protoporfirinógeno IX



Protoporfirina IX.

FIGURA I.5.: Representación de uro, copro y protoporfirina y sus respectivos porfirinógenos, correspondientes a la serie isomérica III.

### I.3.3.1. Complejos hierro-porfirina

El protohemo (Figura I.6.) es la ferroprotoporfirina, es decir el quelato de protoporfirina con un ion ferroso. Este compuesto puede oxidarse a ferriprotoporfirina. El complejo férrico tiene una carga positiva residual, y se aísla generalmente como haluro, siendo el cloruro el anión más común (Figura I.7.).

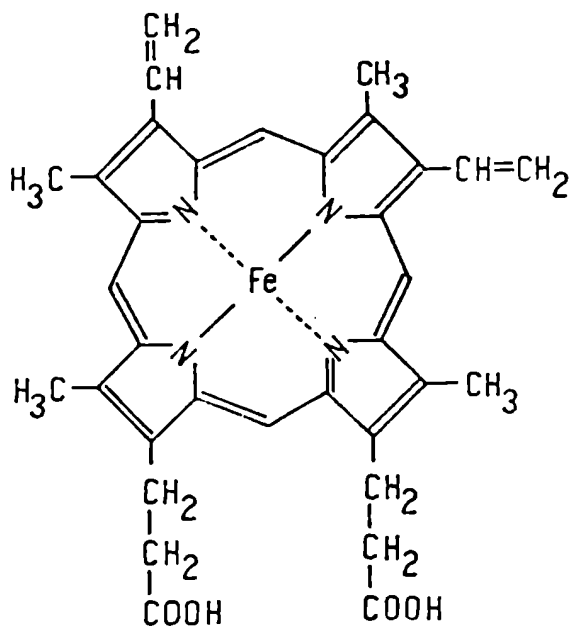


FIGURA I.6.: Protohemo

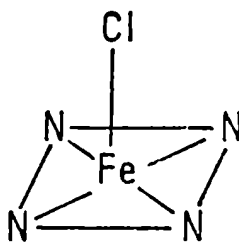


FIGURA I.7.: Clo-  
rohe-  
mina

Aunque este compuesto se conoce como cloruro de hemina, el ion cloruro está coordinado al metal, formando un complejo pentacoordinado piramidal de base cuadrada (Falk y Perrin, 1961) y por lo tanto el nombre cloro-hemina es más apropiado. En solución alcalina, el haluro es reemplazado por el ion hidroxilo formando hidroxihemina o hematina.

El hemo posee una estructura en la cual los cuatro anillos pirrólicos y el hierro están ubicados en un plano; el ion metálico posee aún capacidad para unirse por medio de enlaces coordinados con dos moléculas que se ubican por abajo y arriba del plano del anillo porfirínico. Estos derivados se conocen como hemocromos o hemocromógenos. Entre los compuestos que pueden coordinarse con el átomo de hierro, encontramos el peróxido de hidrógeno, el oxígeno, el monóxido de carbono, los iones cianuro y una gran gama de bases nitrogenadas como la piridina y el amonio.

La Figura I.8. muestra la estereoquímica octahédrica de la piridina-hemocromo.

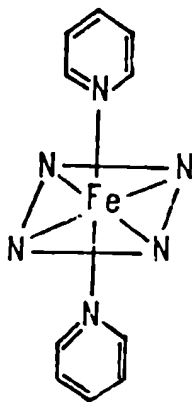


FIGURA I.8.: Piridina-hemocromo

La hemina también da lugar a complejos similares, conocidos como micromos o hemicromógenos.

### I.3.3.2. Complejos magnesio-porfirina

Las clorofilas y bacterioclorofilas son tetrapirroles derivados de la clorina (Figura I.9.)

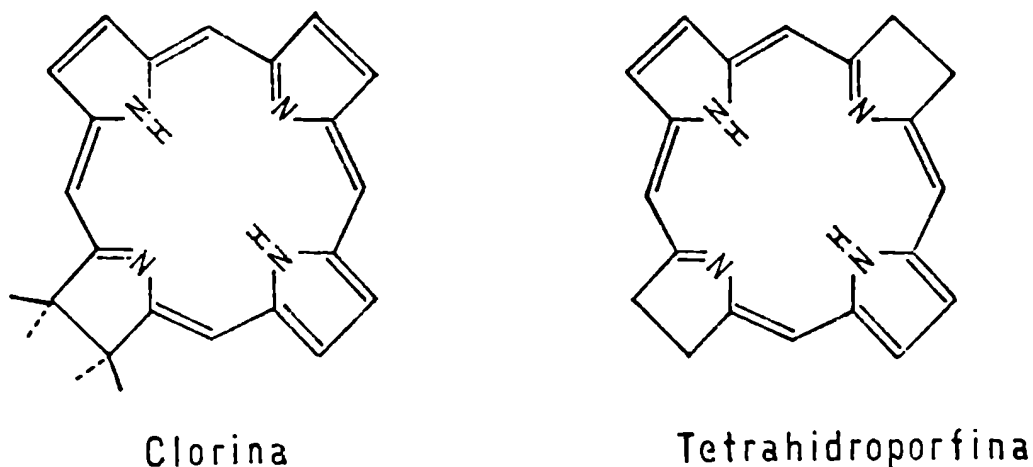


FIGURA I.9.: Clorina y tetrahidroporfina

La posición  $\delta$  en las clorinas es particularmente susceptible al ataque por agentes electrofílicos (Katz y col, 1962; Woodward y Skaric, 1961).

Las clorofilas *a* y *b* (Figura I.10.) son derivados de la dihidroporfina (Figura I.9.) y la bacterioclorofila (Figura I.10.) está relacionada con la tetrahidroporfina (Figura I.9.).

Las clorofilas difieren en su estructura de los hemos en cuatro aspectos importantes:

- 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  $\gamma$ .
- 4) La cadena lateral propiónica en C-7 está esterificada con un alcohol isoprenoide de cadena larga, generalmente fitol.

Las clorofilas difieren entre sí en los sustituyentes de los carbonos externos de los anillos pirrólicos.

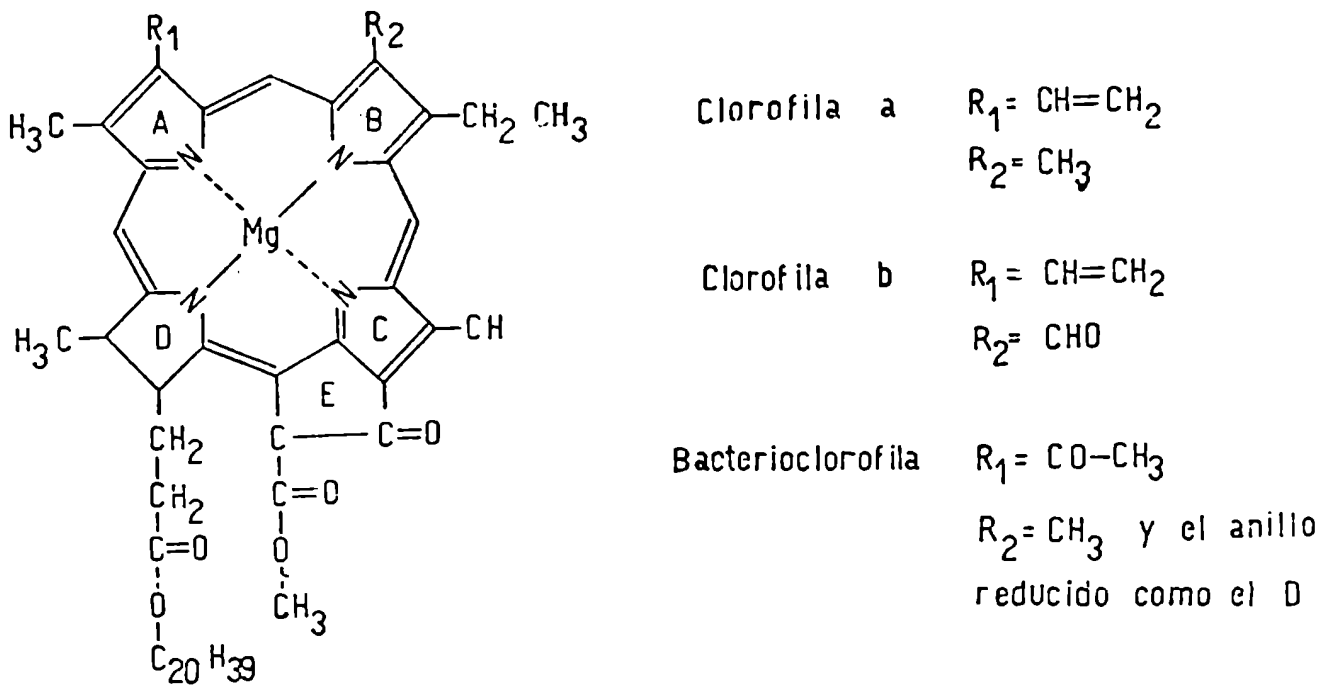


FIGURA I.10.: Estructura de las clorofilas

Todas las clorofilas *in vivo* están unidas a complejos lipoproteicos, pero aún se desconoce la naturaleza de la unión.

### I.3.3.3. Vitamina B<sub>12</sub>

El grupo de la vitamina B<sub>12</sub> (conocida también como cianocobalamina) está formado por complejos tetrapirrólicos de cobalto. Contiene un tipo poco común de núcleo tetrapirrólico (corrina) en el cual los anillos A y D están unidos directamente (Figura I.11).

La naturaleza y posiciones relativas de las cadenas laterales de este núcleo son similares a los de la uroporfirina III, conformando así el patrón de cadena lateral de todos los pigmentos tetrapirrólicos funcionales. Los grupos metilo extras son únicos en la vitamina B<sub>12</sub> y compuestos relacionados. La ruta biosintética de la vitamina B<sub>12</sub> tiene varias etapas en común con la biosíntesis de la protoporfirina.



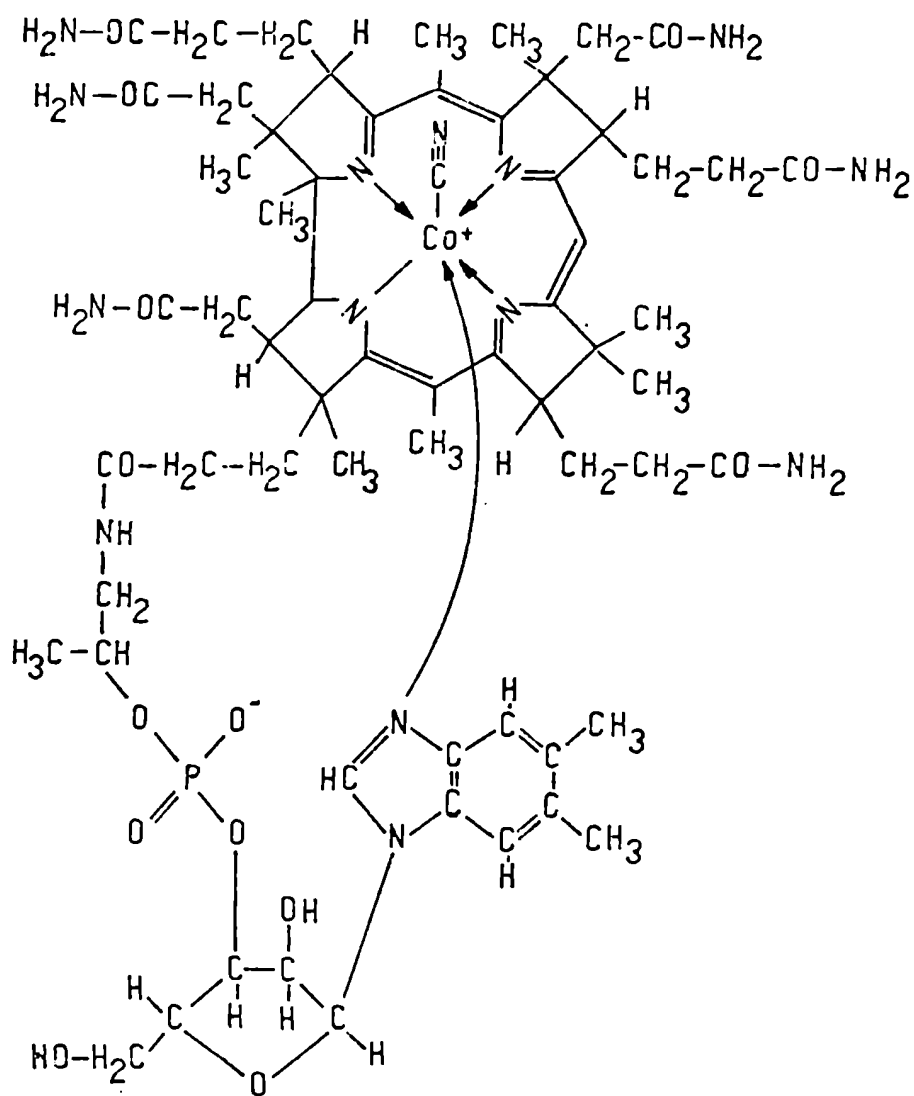


FIGURA I.11.: Cianocobalamina

#### I.3.4. Tetrapirroles de cadena abierta

Los pigmentos biliares (Lemberg y Legge, 1949) son derivados no-cíclicos que se forman durante la degradación natural de las hemoproteínas; en ellos el anillo tetrapirrólico se abre por oxidación enzimática y posterior pérdida del carbono  $\alpha$ -metano como monóxido. Los grupos hemo libres de proteína y las porfirinas no son degradadas a pigmentos biliares *in vivo*. Dos pigmentos biliares importantes son la biliverdina y la bilirrubina (Figura I.12.).

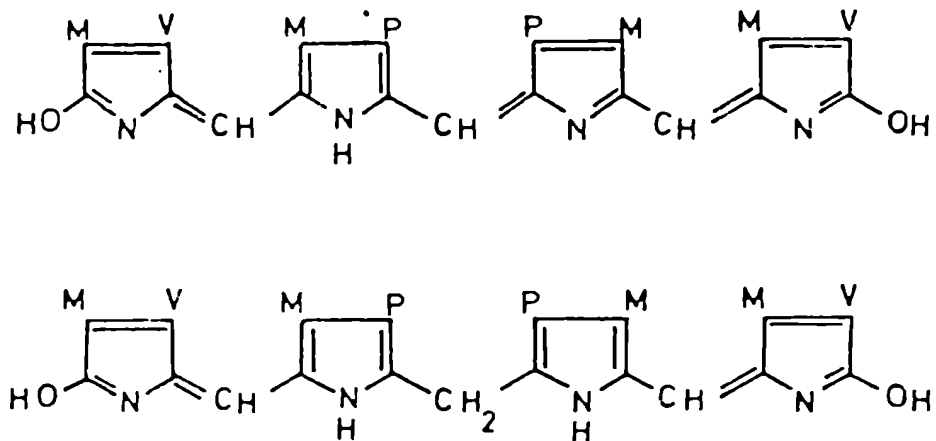


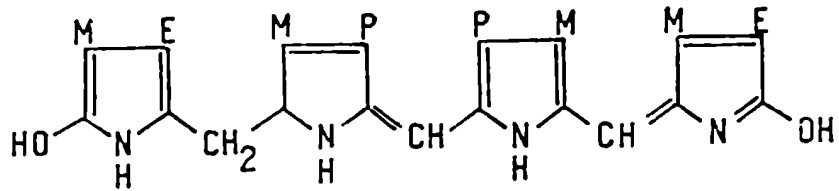
FIGURA I.12.: Estructuras de la Biliverdina IX $\alpha$  y de la Bilirrubina IX $\alpha$ .  
M: -CH<sub>3</sub>; V: -CH=CH<sub>2</sub>;  
P: -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH

La formación *in vitro* de los pigmentos biliares se ha estudiado intensivamente, tratando los derivados de la hemoglobina con varios reactivos que los convierten en pigmentos verdes (Schwartz e Ikeda, 1955).

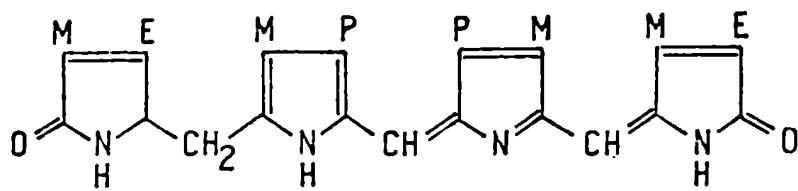
El catabolismo de la hemoglobina ocurre en las células fagocíticas del retículo endotelial. El producto inicial de esta degradación enzimática es la biliverdina IX que por posterior reducción también enzimática se transforma en bilirrubina. Este último compuesto es transportado al hígado donde se convierte enzimáticamente en su diglucurónido (soluble en agua) y se excreta por vía biliar en el duodeno (Schmid, 1966). El diglucurónido se hidroliza en la porción inferior del tracto intestinal a ácido glucurónico y bilirrubina, esta última se excreta como tal o es transformada por la flora intestinal.

Las ficobilinas de las algas rojas y azul-verdosas son en realidad cromoproteínas solubles en agua, que poseen pigmentos

biliares como grupos prostéticos. Hay dos tipos de ficobilinas, la ficocianina (azul) y la ficoeritrina (roja), para las cuales se han propuesto las estructuras que se ilustran en la Figura I.13.



Ficocianobilina



Ficoeritrobilina

FIGURA I.13.: 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.4. DISTRIBUCION Y FUNCION DE LOS TETRAPIRROLES

Los tetrapirroles en la forma de hemoproteínas y clorofilas están presentes tanto en microorganismos unicelulares como en animales superiores. La única excepción parecen ser las bacterias estrictamente anaeróbicas que obtienen su energía por fermentación de sustratos orgánicos. Los distintos derivados tetrapirrólicos ejercen su principal acción en el metabolismo energético, como transportadores de oxígeno (hemoglobina), como transportadores de electrones (citocromos) o como agentes responsables de la captación de energía radiante (clorofila); además constituyen el grupo prostético de varias enzimas, tales como catalasas, peroxidasas, triptofano-pirrolasa.

En condiciones fisiológicas sólo se detectan pequeñas cantidades de porfirinas libres (no complejadas con metales), correspondientes a los isómeros I y III de uro y copro y también proto IX. En condiciones patológicas es posible encontrar cantidades mayores de dichos compuestos además de porfirinas con 7, 6, 5 y 3 grupos  $-COOH$  (Schwartz, 1953; Falk, 1954, 1955; Goldberg y Rimington, 1962). El monopirrol PBG se excreta en grandes cantidades en ciertas orinas patológicas, condiciones en las que puede convertirse no-enzimáticamente en uroporfirina I (Goldberg y Rimington, 1962). Proto y deuteroporfirinas se encuentran normalmente en las heces de carnívoros, como resultado de la descomposición bacteriana de compuestos protohémicos ingeridos con la carne; la ficoeritrina aparece en herbívoros por una vía similar a partir de la clorofila.

El complejo de uroporfirina III con cobre se encuentra en altas concentraciones en las plumas de *Turacus indicus* (Nicholas y Rimington, 1951). También se ha reportado la existencia de una Mn-porfirina en sangre (Borg y Cotzias, 1958).

Las hierro-porfirinas (hemos) no se encuentran libres en condiciones normales, aunque la hemina puede depositarse en los tejidos en condiciones patológicas como resultado de extravasaciones sanguíneas.

#### I.4.1. Hemoproteínas

El término hemoproteína se usa para denominar aquellas proteínas que contienen como grupo prostético un quelato tetrapirrólico de hierro. En muchas hemoproteínas, el protohemo se une a la proteína específica por coordinación entre el átomo de hierro y los átomos de nitrógeno de las cadenas laterales básicas de la proteína. En otras hemoproteínas como el citocromo c, existen uniones covalentes adicionales entre las cadenas laterales de la porfirina y los residuos aminoácido.

##### I.4.1.1. Hemoglobina

La hemoglobina es el principal componente de los glóbulos rojos, responsable del transporte de oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos a través de arterias, arteriolas y capilares.

lares. Participa también en el transporte de dióxido de carbono desde los tejidos hasta los pulmones.

La hemoglobina de mamíferos tiene un peso molecular de 64.500 y contiene cuatro moléculas de protohemo por mol de globina.

Cada uno de los cuatro átomos de hierro en la hemoglobina puede combinarse con un mol de oxígeno, en esta forma la molécula se denomina oxihemoglobina. Tanto en la oxihemoglobina como en la hemoglobina libre de oxígeno, el átomo de hierro existe en el estado ferroso. La capacidad de combinarse reversiblemente con el oxígeno no es una propiedad del hierro ferroso mismo, ni del ion ferroso del protohemo. Solamente cuando el protohemo forma un complejo con la globina, el ion ferroso adquiere dicha característica. Cuando el protohemo está complejo con otras proteínas, por ejemplo, peroxidasa o catalasa, exhibe un comportamiento diferente. Si el átomo de hierro de la hemoglobina está oxidado al estado férrico, el compuesto resultante se llama metahemoglobina y es incapaz de transportar el oxígeno.

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

También existen hemoproteínas transportadoras de oxígeno en la hemolinfa de muchos invertebrados. En la mayoría de estas hemoproteínas que contienen protohemo como grupo prostético, la unidad proteica tiene un peso molecular mayor que el de la globina (Lascelles, 1964).

#### 1.4.1.2. Mioglobina

La mioglobina es una hemoproteína similar a la hemoglobina en cuanto a su capacidad de unir oxígeno reversiblemente. Está presente en los músculos de todos los vertebrados e invertebrados y en el hombre predomina en el músculo cardíaco. La mioglobina tiene mayor afinidad por el oxígeno que la hemoglobina y es capaz de aceptar el oxígeno de esta última para almacenarlo en las células del músculo. Cuando los niveles de oxígeno llegan a ser limitantes, la mioglobina libera el oxígeno a la citocromo oxidasa que tiene mayor afinidad por dicho elemento que la mioglobina.

Se acepta que el alto contenido de mioglobina en los músculos de los animales acuáticos facilita la inmersión de éstos por períodos prolongados.

La estructura de la mioglobina es más simple que la de la hemoglobina. Consiste en una sola cadena polipeptídica y tiene un grupo protohemo (Marks, 1969).

#### I.4.1.3. Citocromos

Los citocromos son 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 (Florkin y Stotz, 1963).

Los citocromos se clasifican en a, b, c y d, de acuerdo a la naturaleza y modo de unión de sus unidades hémicas a la proteína (Keilin, 1930).

- Citocromos a: El grupo prostético hemo contiene una cadena lateral formilo.
- Citocromos b: Tienen el protohemo como grupo prostético.
- Citocromos c: El hemo y la proteína están unidos a través de uniones covalentes entre cadenas laterales.
- Citocromos d: Contienen hierro-dihidroporfina (clorina) como grupo prostético.

En las células animales los citocromos están localizados en la mitocondria, donde junto con la ubiquinona, flavín-adenín-dinucleótido (FAD) y nicotinamida adenín dinucleótido (NAD), constituyen un sistema de transporte de electrones altamente organizado.

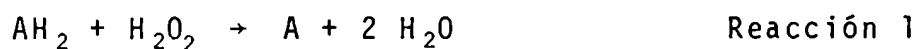
Es importante notar que mientras el átomo de hierro permanece divalente en la hemoglobina y mioglobina, el hierro de las unidades hémicas de los citocromos se oxida y reduce reversiblemente cuando los electrones son transportados desde el sustrato al oxígeno.

NAD → FAD → ubiquinona → citocromo b → citocromo c<sub>1</sub> → citocromo c → citocromo a (a<sub>3</sub>) → O<sub>2</sub>

También se han encontrado citocromos en algunas bacterias estrictamente anaeróbicas. Por ejemplo en *Desulfovibrio desulfuricans*, un organismo anaeróbico estricto, los citocromos están involucrados en el transporte de electrones asociado a la reducción del sulfato (el aceptor final de electrones) a sulfuro (Newton y Kamen, 1961).

#### I.4.1.4. Peroxidasas

Las peroxidasas son enzimas que catalizan la oxidación de varias clases de compuestos orgánicos por peróxido de hidrógeno (Reacción 1).



donde  $AH_2$ , el donador de hidrógeno, puede ser un fenol, una amina primaria, secundaria o terciaria, ácido ascórbico o indol. Ciertos iones inorgánicos, particularmente el ioduro, son oxidados por peroxidasas.

Las peroxidasas pueden dividirse en dos tipos de acuerdo a la naturaleza de sus grupos prostéticos: las peroxidasas flavoproteicas y las peroxidasas que contienen hierro. Estas últimas a su vez se subdividen en dos grupos: las que poseen protohematina y las que contienen quelatos tetrapirrólicos de hierro no-identificados.

#### I.4.1.5. Catalasas

Las catalasas son enzimas que catalizan la descomposición de peróxido de hidrógeno de acuerdo a la siguiente reacción (Reacción 2):



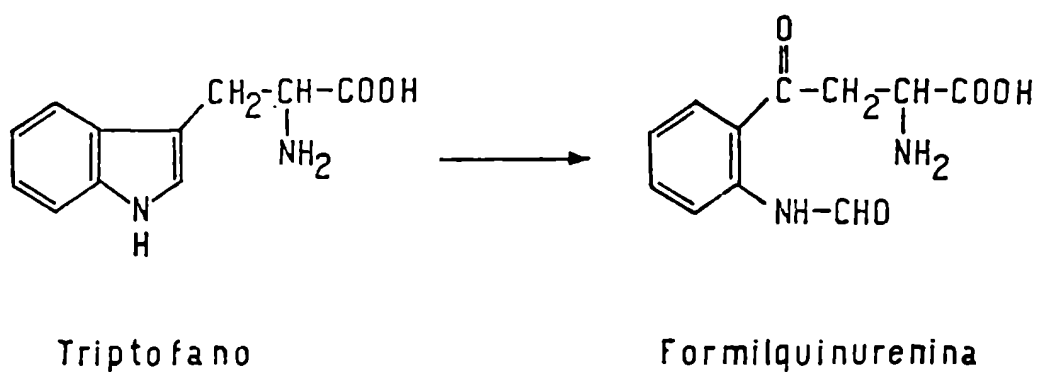
En ciertas condiciones las catalasas pueden actuar como peroxidasas.

La función fisiológica de la catalasa es un tema de controversia. Algunos autores consideran que poseen un rol protector destruyendo el  $H_2O_2$ , que es tóxico para los seres vivos (Lemberg y Legge, 1949) mientras que otros autores le asignan

una función peroxidativa (Keilin y Hartree, 1945).

#### I.4.1.6. Triptofano pirrolasa

La triptofano pirrolasa es la hemoproteína que cataliza la oxidación del triptofano a formil quinurenina (Reacción 3).



Reacción 3

El mecanismo de la reacción enzimática involucra la oxigenación directa del triptofano por oxígeno molecular. Se vió que el peróxido era necesario para convertir la enzima férrica inactiva en su forma ferrosa activa.

Su capacidad de combinarse con el oxígeno, manteniendo el hierro en el estado ferroso, la asemeja a la hemoglobina (Marks, 1969).



## REFERENCIAS

- Badger, G.M.; Harris, R.L.N.; Jones, R.A. & Sasse, J.M. (1962) J. Chem. Soc. 4329.
- Bogorad, L. & Granick, S. (1953) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 39, 1176.
- Borg, D.C. & Cotzias, G.C. (1958) Nature 182, 1677.
- Cookson, C. & Rimington, C. (1953) Chemical Constitution Nature 171, 875.
- Corwin, A.H.; Walter, J.A. & Singh, R. (1962) J. Org. Chem. 27, 4280.
- Dresel, E.I.B. & Falk, J.E. (1953) Nature 172, 1185.
- Falk, J.E. (1954) Biochem. Soc. Symp. (Cambridge, Engl.) 12, 17.
- Falk, J.E. (1955) en "Porphyrin Biosynthesis and Metabolism" (Eds. G.E. Wolstenholme & E.C.P. Millar), Churchill, London, p. 63.
- Falk, J.E. & Perrin, D.D. (1961) en "Haematin Enzymes" (Eds. J. E. Falk, R. Lemberg & R.K. Morton), Pergamon, London, p.56.
- Falk, J.E.; Dresel, E.I.B. & Rimington, C. (1953) Nature 172, 292.
- Fischer, H. & Orth, H. (1937) en "Die chemie des Pyrrols". Akad. Verlagsgesellschaft, Leipzig, Vol 2, part 1.
- Florkin, M. & Stotz, E.H. (1963) en "Comprehensive Biochemistry" (Eds. M. Florkin and E.H. Stotz), Elsevier, Amsterdam, Vol. 13, p. 21.
- Goldberg, A. & Rimington, C. (1962) en "Diseases of Porphyrin Metabolism" (Ed. Charles C. Thomas) Springfield, Ill.
- Katz, J.J.; Thomas, M.R. & Strain, H.H. (1962) J. Am. Chem. Soc. 84, 3587.
- Keilin, D. (1930) Proc. R. Soc. B 106, 418.
- Keilin, D. & Hartree, E.F. (1945) Biochem. J. , 293
- Lascelles, J. (1964) en "Tetrapyrrole biosynthesis and its regulation" (Ed. W.A. Benjamin, Inc.) New York, Amsterdam.
- Lemberg, R. & Legge, J.W. (1949) en "Haematin Compounds and Bile Pigments". Interscience, New York, p. 416.

- Marks, G.S. (1969) en "Heme and Chlorophyll" D. Van Nostrand Company, London.
- Mason, S.F. (1958) J. Chem. Soc., 976.
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1141.
- Neuberger, A. & Scott, J.J. (1953) Nature 172, 1093.
- Newton, J.W. & Kamen, M.D. (1961) en "The bacteria" (Eds. I.C. Gunsalus and R.Y. Stanier), Academic Press, New York, Vol. 2, p. 397.
- Nicholas, R.E.H. & Rimington, C. (1951) Biochem. J. 50, 194.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963) Biochem. J. 87, 181.
- Rimington, C. (1955) en "Porphyrin Biosynthesis and Metabolism" (Eds. G.E. W. Wolstenholme and E.C.P. Millar), Churchill, London, p. 30.
- Rimington, C. & Krol, C. (1955) Nature 175, 629.
- Sachs, D. (1931) Klin Wochschr 10, 1123.
- Sano, S. & Granick, S. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1173.
- Schmid, R. (1966) en "The Metabolic Basis of Inherited Diseases" (Eds. J.B. Stanbury, J.B. Wyngarden and D.S. Fredrickson), Mc Graw-Hill, New York, 2nd. Ed., p.871.
- Schwartz, S. (1953) Veterans Admin. Tech. Bull, 6, 10.
- Schwartz, S. & Ikeda, S. (1955) Ciba Found Symp. on porphyrin biosynthesis and metabolism (Churchill, London) p. 209.
- Shemin, D. (1954) Harvey Lectures 50, 258.
- Waldenström, J. & Wahlquist, B.C. (1939) Hoppe-Seyle's 7 Physiol. Chem. 260, 189.
- Watson, C.J.; Pimenta de Mello, R.; Schwartz, S.; Hankinson, V. & Bossenmaier, I. (1951) J. Lab. Clin. Med. 37, 831.
- Whalley, M. (1955) Special Publication N°3, Chem. Soc. (London), 98.
- Woodward, R.B. & Skaric, V. (1961) J. Am. Chem. Soc. 83, 4676.

BIOQUIMICA DE LOS TETRAPIRROLES

---

	Página
II.1. Introducción	22
II.2. Glicocola, acetato y succinil-CoA como precursores del hemo	22
II.3. Enzimas del camino de los tetrapirroles	23
II.3.1. Síntesis de Succinil-CoA: Succinil-CoA-Sintetasa	23
II.3.2. Síntesis de ácido $\delta$ -Aminolevúlico	26
II.3.2.1. $\delta$ -Aminolevúlico-sintetasa	26
II.3.2.2. Dioxoaminovalérico-Transaminasa	26
II.3.3. Síntesis de PBG: ALA-Dehidrasa	30
II.3.4. Síntesis de uroporfirinógeno: Porfobilinogenasa	33
II.3.5. Síntesis de coproporfirinógeno: Uroporfirinógeno-Decarboxilasa	34
II.3.6. Síntesis de protoporfirino: Coproporfirinogenasa	37
II.3.7. Síntesis de protoporfirina: Protoporfirinógeno-Oxidasa	41
II.3.8. Síntesis de Hemo: Ferroquelatasa	43
Referencias	44

## II. BIOQUIMICA DE LOS TETRAPIRROLES

### II.1. INTRODUCCION

La mayoría de las células vivientes son capaces de sintetizar sus tetrapirroles a partir de precursores muy simples.

El camino biosintético del hemo se ilustra en la Figura II.1.

La primera y las tres últimas enzimas de la biosíntesis del hemo están localizadas en la mitocondria; las otras enzimas se encuentran en el citoplasma (Mauzerall y Granick, 1958).

La misma secuencia de reacciones opera en todas las formas vivas hasta la etapa de protoporfirina IX; a partir de allí, dependiendo de cual fuere el producto final, es decir hemos, clorofilas o bacterioclorofilas, se producen las ramificaciones correspondientes.

En cuanto a los aspectos termodinámicos de esta secuencia, solamente la etapa de formación de succinil CoA, es endergónica. Las demás reacciones son exergónicas y, en consecuencia, se encuentran termodinámicamente favorecidas.

### II.2. GLICOCOLA, ACETATO Y SUCCINIL-COA COMO PRECURSORES DEL HEMO

Hasta 1945 se desconocía la estructura de los precursores del hemo; recién entonces, con la introducción de las técnicas isotópicas Shemin y Rittenberg (1945) demostraron, usando primero glicocola marcada con  $^{15}\text{N}$  y luego con  $^{14}\text{C}$ , que este aminoácido proporcionaba los cuatro nitrógenos, además de los cuatro carbonos de los puentes meténicos y otros cuatro de los carbonos  $\alpha$  en los anillos pirrólicos (Figura II.2.).

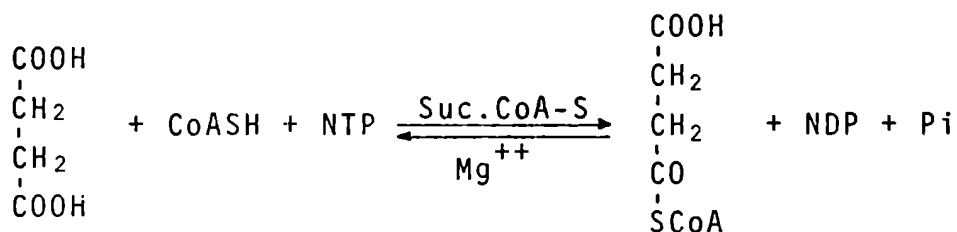
La clave acerca del origen de los 26 átomos de carbono restantes en la molécula de protoporfirina IX, provino asimismo de observaciones fundamentales del laboratorio de Shemin (Bloch y Rittenberg, 1945; Shemin y Rittenberg, 1951). Empleando acetato marcado con  $^{14}\text{C}$ , ya sea en el grupo metilo o en el carboxilo, demostraron que ambos carbonos se incorporaban específicamente

en determinados sitios del tetrapirrol. Poco después se comprobó que en realidad, el acetato entraba al camino del hemo a través de un compuesto activo de cuatro carbonos, la succinil CoA (Shemin y Kumin, 1952).

### II.3. ENZIMAS DEL CAMINO DE LOS TETRAPIRROLES

#### II.3.1. Síntesis de Succinil-CoA: Succinil-CoA-Sintetasa

Numerosas evidencias experimentales han establecido que la succinil-CoA sintetasa (Suc.CoA-S), juega un papel importante en la biosíntesis de las porfirinas y está directamente involucrada en los mecanismos que la controlan (Labbe y col, 1965; Batlle y col, 1975). Esta enzima, conocida también como succinil CoA tioquinasa, cataliza reversiblemente la síntesis de succinil CoA, precursor del hemo, a partir de succinato, coenzima A y un nucleósido trifosfato (Reacción 1).



Reacción 1

Esta enzima fue detectada originalmente por Kaufman en 1951. Ha sido 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 y Grinnel, 1972; Wider de Xifra y Batlle, 1973).

En la mayoría de los tejidos la Suc.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 y Park, 1964), mientras que en tejidos vegetales y bacterianos es específica para ATP (Nandi y Waygood, 1965; Wider de Xifra y Tigier, 1971).

La Suc.CoA-S requiere la presencia de un catión divalente (generalmente  $\text{Mn}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ ) para expresar su máxima actividad.

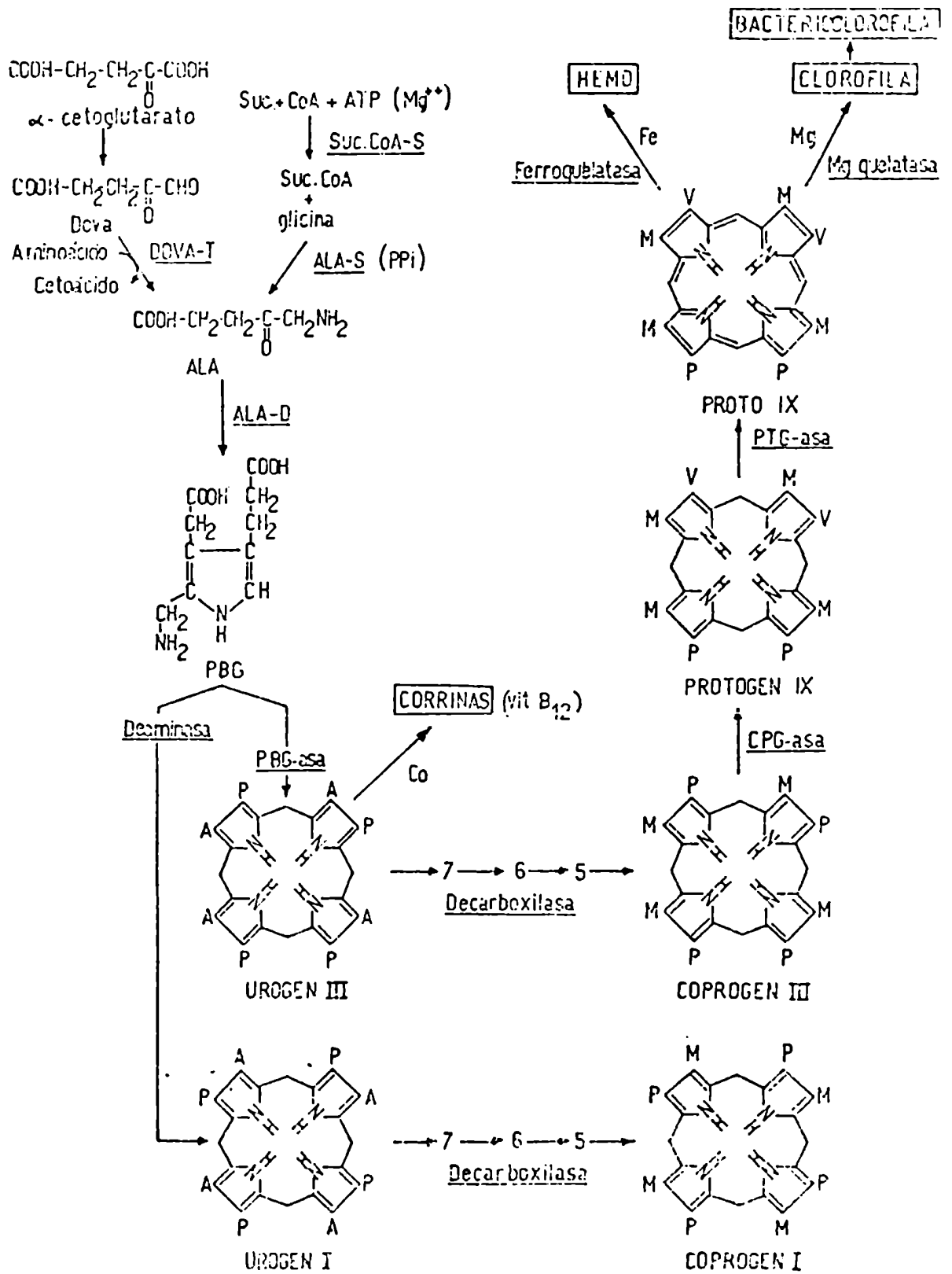


FIGURA II.1.: Esquema de la biosíntesis de tetrapirroles

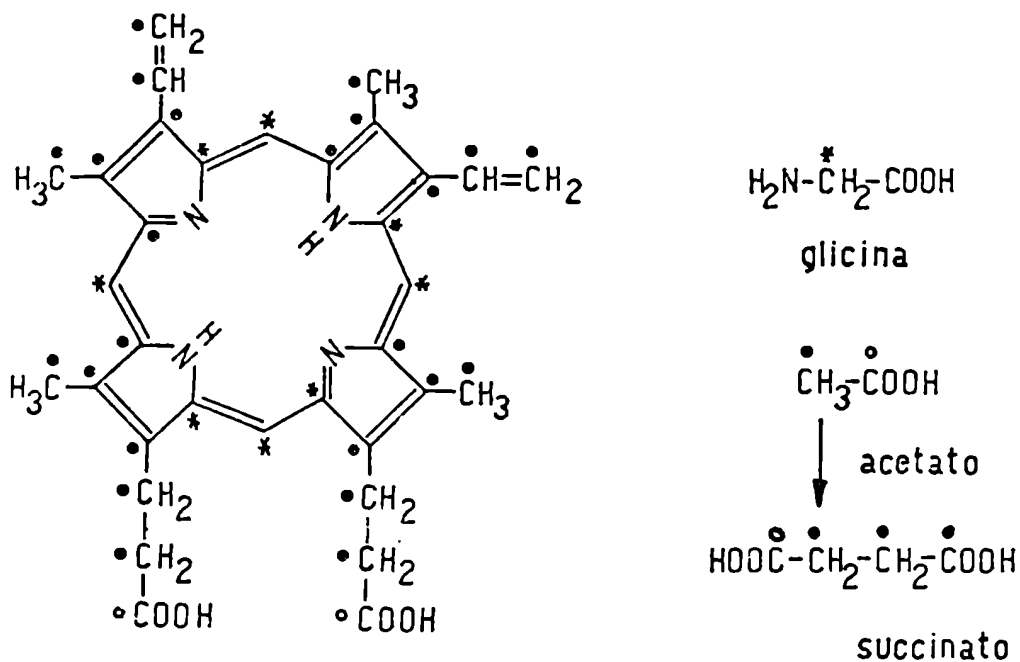


FIGURA II.2.: Origen de los átomos de carbono de la protoporfirina IX.

Se comporta como una enzima sulfhidrúlica, siendo inhibida por p-cloromercuribenzoato, iodobenzoato, iodoacetamida, glutatión oxidado y N-etilmaleimida. En algunos tejidos es necesaria la presencia de un protector de grupos sulfhidrilos, como el glutatión reducido (GSH) para lograr máxima actividad. Sin embargo, otros tioles, como cisteína, tioglicolato y ditiotreitól la inactivan (Wider de Xifra y Tigier, 1971).

El peso molecular de la Suc.CoA-S varía entre 70.000 y 140.000 daltons según la fuente. Mediante el empleo de agentes disociantes, se comprobó que la proteína está formada por dos tipos de subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ), de pesos moleculares 29.000 y 41.000 daltons, por lo tanto se trata de una proteína oligomérica, constituida por dos o cuatro subunidades.

El mecanismo de acción de la Suc.CoA-S es relativamente complejo; se han postulado varios esquemas, de los cuales el más reciente fue propuesto por Wider de Xifra y Batlle (1976). Este modelo (Figura II.3.) tiene en cuenta todas las evidencias experimentales acumuladas hasta ese momento y plantea la posibilidad de caminos alternativos.

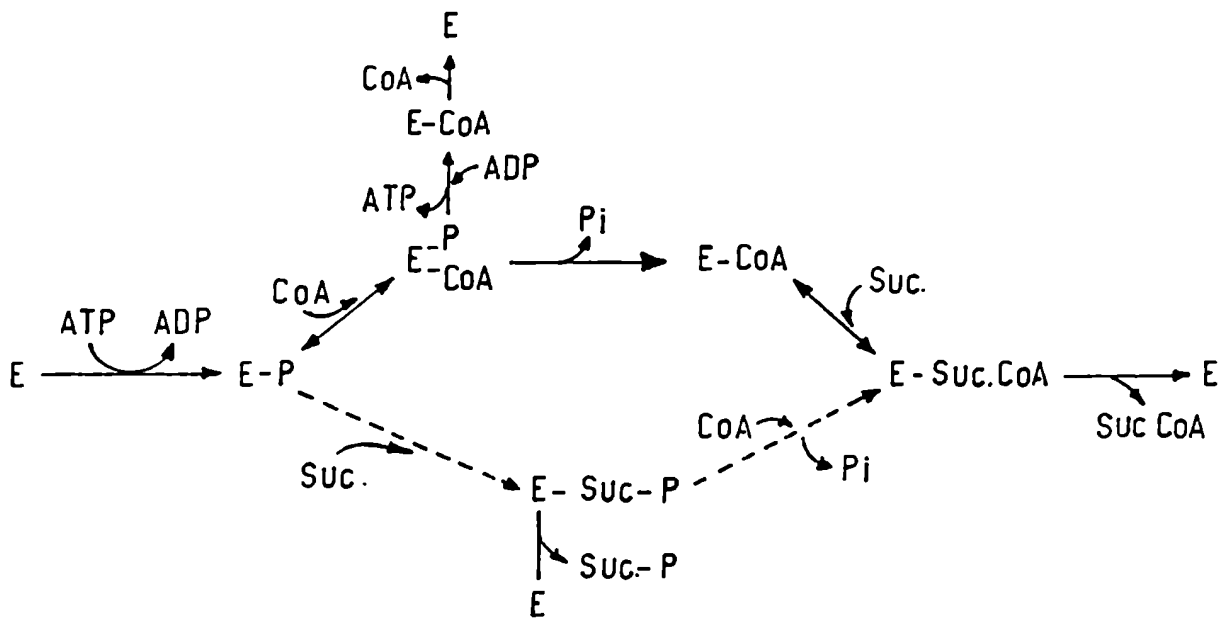


FIGURA II.3.: Mecanismo de acción de la succinil-CoA-sintetasa

### II.3.2. Síntesis de ácido $\delta$ -aminolevúlico

#### II.3.2.1. $\delta$ -Aminolevúlico-Sintetasa

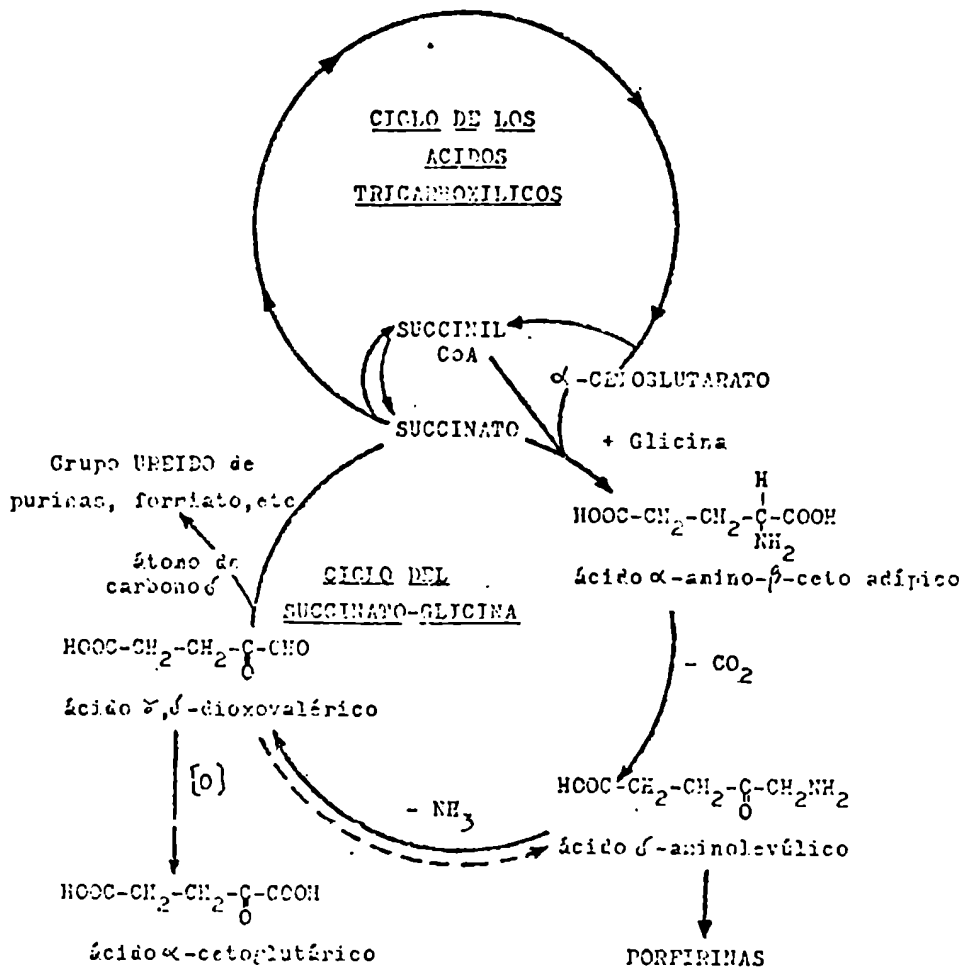
Esta enzima desempeña un rol fundamental en los procesos de regulación de la biosíntesis del hemo y se tratará exhaustivamente en el Capítulo IV.

#### II.3.2.2. Dioxoaminovalérico Transaminasa

En el año 1955, en experimentos en los que se administraba 5-<sup>14</sup>C-ALA a ratas, Shemin y col observaron radioactividad en el CO<sub>2</sub>.respiratorio, formiato urinario y el grupo ureído del ácido úrico. Estos hallazgos permitieron plantear una serie de reacciones que se conocen actualmente como ciclo del succinato-glicina o ciclo de Russell y Shemin (Figura II.4.). Estos investigadores supusieron que el ALA formado por condensación de la glicina con el succinato, podía deaminarse dando  $\gamma,\delta$ -dioxovalerato (DOVA) el cual al perder el grupo carbonilo terminal regeneraría el succinato y liberaría un fragmento de un átomo de carbono



(proveniente del C-2 de la glicina) capaz de participar luego en las conocidas reacciones de la biosíntesis de purinas.



**FIGURA II.4.:** Ciclo del succinato-glicina

Posteriormente, se confirmó la existencia de este ciclo en *Rhodospirillum rubrum* (Shigesada, 1972).

En lo que respecta a la deaminación del ALA, en homogenato de hígado de mamíferos (Kowalski y col, 1957) y en extracto crudo de *Corynebacterium diphtheriae* (Bagdasarian, 1958), se detectó la presencia de una enzima capaz de catalizar la transaminación del ALA con piruvato o  $\alpha$ -cetoglutarato, produciendo alanina y glutamato, respectivamente.

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 *Rp. spheroides* con DOVA y L-alanina se obtiene ALA y piruvato.

Posteriormente, Neuberger y Turner (1963) aislaron, purificaron y caracterizaron la  $\gamma,\delta$ -dioxovalerato transaminasa (DOVA-T) de esta misma bacteria fotosintética.

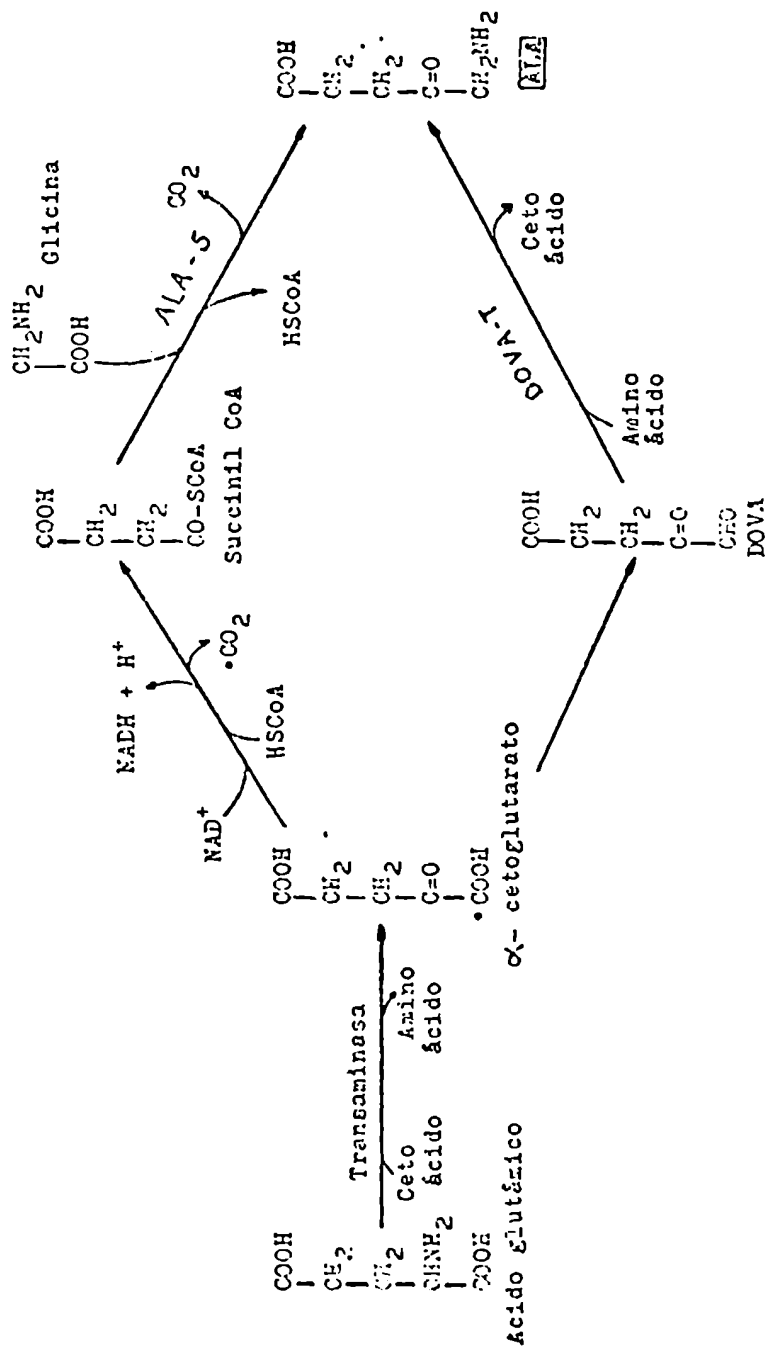
La mayoría de los trabajos realizados en plantas superiores, para las cuales se postula esta vía de síntesis, no utilizan DOVA como sustrato, sino que partiendo de precursores radiactivos de cinco átomos de carbono (glutamato, glutamina,  $\alpha$ -cetoglutarato), prueban la incorporación del esqueleto intacto de los átomos de carbono de estos compuestos en el ALA. Si la síntesis se produjera a través del ALA-S, uno de los cinco átomos de carbono, por ejemplo el C-1 del ácido glutámico, se liberaría como  $\text{CO}_2$  al pasar, vía  $\alpha$ -cetoglutarato a succinato (Figura II.5.).

Solamente, Lohr y Friedmann en el año 1976, purificaron parcialmente, a partir de hojas de *Zea mays*, dos enzimas que catalizan la conversión de  $\alpha$ -cetoglutarato a DOVA y de DOVA a ALA, respectivamente.

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, según este mecanismo, corresponden a los complejos enzima-fosfato de piridoxal y enzima-fosfato de piridoxamina, respectivamente. Con la primera de estas formas se uniría el aminoácido mientras que el DOVA lo haría con la segunda de ellas.

La reacción catalizada por la DOVA-T, a diferencia de lo que ocurre con la mayoría de las transaminasas, es irreversible.

Varticovski y col (1980) purificaron la DOVA-T de mitocondria de hígado bovino. La enzima era muy estable, con un peso molecular de 240.000 daltons y requería fosfato de piridoxal como cofactor. Tenía alta afinidad por el amino donador (L-alanina) y por el amino aceptor ( $\gamma,\delta$ -dioxovalerato). La capacidad de la DOVA-T de sintetizar ALA parece muy superior a la capacidad del ALA-S de mitocondria de hígado bovino. Aún no se ha establecido si los requerimientos de hemo pueden modificar la actividad de DOVA-T en las células, cumpliendo así alguna acción regulatoria.



**FIGURA II.5.:** Caminos biosintéticos para la formación de ALA partiendo de un mismo sustrato, el ácido glutámico.

### II.3.3. Síntesis de PBG: ALA-Dehidrasa

La  $\delta$ -aminolevúlico-dehidrasa (ALA-D), también conocida como porfobilinógeno sintetasa, cataliza la ciclación de dos moléculas del compuesto alifático ALA para dar un derivado heterocíclico, el porfobilinógeno (PBG). En este proceso se pierden dos moléculas de agua.

El ALA-D está ampliamente distribuída en la naturaleza: en células parenquimales y sanguíneas de las más diversas especies animales (Batlle y col, 1967; Tomio y col, 1968; Barreiro, 1969; Shetty y Miller, 1969; Moore y col, 1971) y en el hombre (Calissano y col, 1966; Nakao y col, 1968; Collier, 1971); en células de trigo (Nandi y Waygood, 1967); tabaco (Shetty y Miller, 1969) y otras plantas (Carell y Kahn, 1964; Tigier y col, 1968, 1970); en células de levaduras (Barreiro, 1969); en hongos (Muthukrishman y col, 1969, 1972) y bacterias (Nandi, 1971; Yamasaki y Moriyama, 1971).

El ALA-D es una enzima citoplasmática soluble (Granick y Mauzerall, 1958), lo cual implica que una vez que el ALA se ha sintetizado dentro de la mitocondria debe difundir al citoplasma, para ser luego convertido en PBG.

Es una enzima termoestable y típicamente sulfhidrúlica. En la mayoría de los tejidos estudiados necesita la presencia de un compuesto reductor tiólicoo como por ejemplo cisteína o glutatióon, para actuar con un máximo de actividad. Es muy sensible a agentes bloqueantes de grupos -SH, como los metales pesados (plomo, mercurio, cadmio) u otros reactivos como p-cloromercuribenzoato o iodoacetamida, que inhiben significativamente al ALA-D, a concentraciones muy bajas. La enzima de algunas fuentes se activa en presencia de ciertos cationes como por ejemplo, cinc, cobre y aluminio. Así la actividad de ALA-D inhibida por plomo, puede ser restaurada completamente por el agregado de ditiotreitool (Granick y col, 1973) o  $Zn^{2+}$  (Finelli y col, 1975). El plomo evidentemente no interfiere con la síntesis de ALA-D en eritrocitos humanos, sino que inhibe su actividad enzimática de una manera no-competitiva (Granick y col, 1973).

El ALA-D es una enzima oligomérica, de peso molecular 280.000, constituída por 8 subunidades similares y al parecer la estructura mínima funcional correspondería a la de un dímero de peso molecular 70.000 (Batlle y col, 1978). En el sitio activo

de la enzima hay dos residuos cisteína, un átomo de  $Zn^{2+}$  y dos residuos histidina. La fotooxidación de los residuos histidina disminuye la actividad enzimática y la cantidad de  $Zn^{2+}$  unido, sugiriendo que las histidinas no solamente ocupan el sitio catalítico de la enzima, sino que también sirven como un posible ligando para el  $Zn^{2+}$  (Tsukamoto y col, 1979). En realidad el  $Zn^{2+}$  puede proteger los grupos sulfhidrilos esenciales de la autooxidación por coordinación con ellos (Bevan y col, 1980), pero dicho metal no es catalíticamente esencial si la autooxidación de la enzima puede prevenirse por otros medios. Se demostró que el  $Cd^{2+}$  restaura la actividad de la apoenzima (Bevan y col, 1980).

Actualmente se acepta que el mecanismo de reacción del ALA-D procede de la siguiente manera: una molécula de ALA se une covalentemente a la enzima a través de la formación de una base de Schiff entre el grupo  $\epsilon$ -amino del residuo lisina y el grupo ceto del ALA. Este carbanión estabilizado participa luego en una condensación aldólica de la segunda molécula de ALA con liberación de una molécula de agua (Nandi y Shemin, 1968). En la Figura II.6. se ilustra el modelo más reciente postulado por Batlle y Stella (1978). Posteriormente Jordan y Seehra (1980) demostraron que la primer molécula de ALA unida inicialmente a la enzima da origen a la cadena lateral de ácido propiónico del PBG.

En la mayoría de los tejidos mamíferos, la actividad de ALA-D está presente en un nivel casi 100 veces superior al del ALA-S. En realidad la concentración de ALA-D está en exceso respecto de las otras enzimas del camino biosintético del hemo. Sin embargo, si esta enzima se hallara marcadamente inhibida, se produciría una disminución en la velocidad de formación del hemo (Ebert y col, 1979).

Se sabe que el plomo inhibe significativamente la actividad del ALA-D *in vivo* dando como resultado una excesiva excreción de ALA en orina y, por lo menos en el caso de exposición aguda, el metal también puede reducir el nivel e integridad funcional del citocromo P-450 microsomal (Alvares y col, 1972). Además el nivel del citocromo P-450 se encontró disminuido en ratas tratadas con aminotriazol (Kato, 1967), un inhibidor de la actividad de ALA-D, sugiriendo que la actividad disminuida del ALA-D puede limitar la formación de hemo para la síntesis del citocromo microsomal (Tephly, 1978).

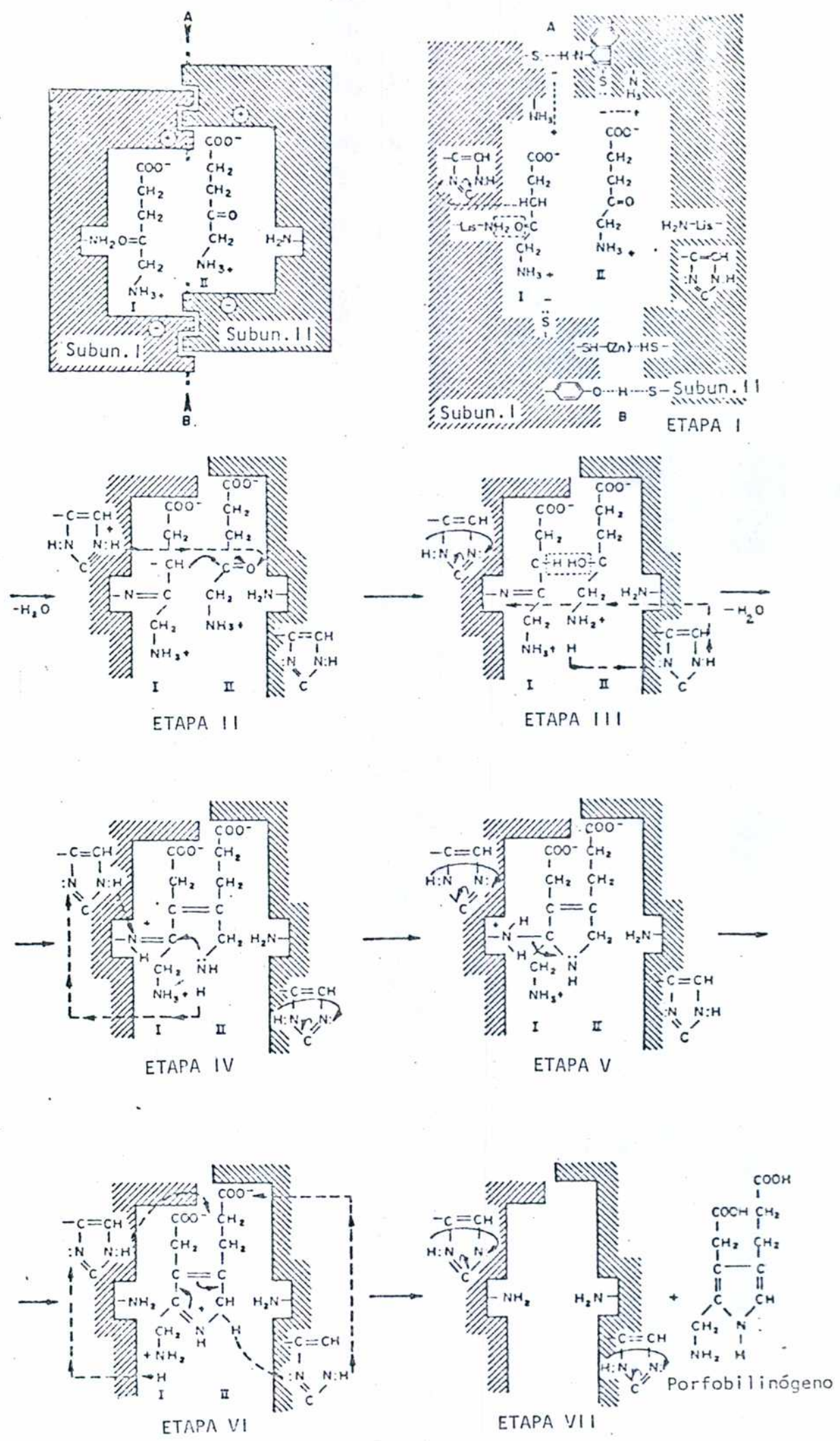


FIGURA II.6.: Mecanismo de acción propuesto para el ALA-D

#### II.3.4. Síntesis de uroporfirinógeno: Porfobilinogenasa

El término porfobilinogenasa (PBGasa) fue propuesto por Lockwood y Rimington (1957), para designar al sistema enzimático que cataliza la condensación de cuatro moléculas de PBG en el primer tetrapirrol cíclico, el uroporfirinógeno III, intermedio fisiológico en la biosíntesis del hemo, clorofilas y corrinas. La PBGasa es un complejo proteico formado por dos enzimas diferentes, la uroporfirinógeno I sintetasa (Uro-S) o deaminasa, proteína termoestable, y la uroporfirinógeno III-cosintetasa (Uro-CoS) o isomerasa, que es el componente termolábil.

La deaminasa cataliza la condensación de cuatro moléculas de PBG para formar un tetrapirrol cíclico simétrico, el uroporfirinógeno I (Urogen-I). 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 PBGasa, transforma cuatro 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. La cantidad relativa de isomerasa es generalmente mucho mayor que la de deaminasa (Frydman y Feinstein, 1974), asegurándose así la formación de urogen tipo III.

La PBGasa se ha estudiado en sistemas vegetales, animales y bacterianos (Batlle y Rossetti, 1977). Es una enzima citoplasmática y sulfhidrónica. Tanto la PBGasa, como sus componentes deaminasa e isomerasa, se han aislado y purificado a partir de numerosos organismos y se han determinado sus propiedades.

Los estudios cinéticos indican que la PBGasa presenta las características de una enzima alostérica, en algunos casos se observa cooperatividad positiva y en otros una combinación de cooperatividad positiva y negativa (Sancovich y col, 1969; Llambías y Batlle, 1970 a y b; Llambías y col, 1971); de todos modos es evidente que la entrada de la primera molécula de PBG al sitio activo de la enzima controla la entrada de las siguientes.

En ciertos tejidos y bajo determinadas condiciones se han aislado intermediarios polipirrónicos, de diferente longitud, que según provengan de la acción del complejo PBGasa sobre el PBG, o sólo de la deaminasa sobre el PBG, ya llevan preformada la estructura del isómero normal III o del isómero I, respectivamente (Llambías y Batlle, 1970 c; 1971; Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti y col, 1977).

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.

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

Una consideración importante de este modelo es que la etapa de isomerización que lleva al tipo III ocurriría, aparentemente, al inicio de la reacción, inmediatamente después de la unión de la primer molécula de PBG al complejo, formándose, por unión cabeza-cola con la segunda molécula de PBG, un dipirrol ya isomerizado.

Sin embargo, trabajos posteriores (Battersby y col, 1979; Burton y col, 1979) propusieron que, en realidad, el uroporfirínógeno III se formaría a partir de un preuroporfirínógeno o tetrapirrilmetano no isomerizado, resultado de la condensación secuencial de cuatro moléculas de PBG por acción de la deaminasa. La isomerasa emplearía a este bilano como sustrato, produciendo finalmente el uroporfirínógeno III (Jordan y col, 1979; Jordan y Sehra, 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.

#### II.3.5. Síntesis de Coproporfirínógeno: Uroporfirínógeno decarboxilasa

La decarboxilación secuencial de las cuatro cadenas de ácido acético del uroporfirínógeno III, por acción de la enzima citoplasmática uroporfirínógeno decarboxilasa (Uro-Dcasa) lleva a la formación de coproporfirínógeno III, con liberación de cuatro moles de CO<sub>2</sub>. Esta enzima ha sido estudiada en reticulocitos de conejo (Granick y Mauzerall, 1958), bazo de ratón (Romeo y Levin, 1971); eritrocitos de aves (Hoare y Heath, 1958; Batlle y Grinstein, 1964; Tomio y col, 1970) y humanos (Elder y Tovey, 1977; Elder, 1982); glándula de Harder (Tomio y Grinstein, 1968); hígado de rata (Aragonés y col, 1972) e hígado de cerdo (Kushner y col, 1975).



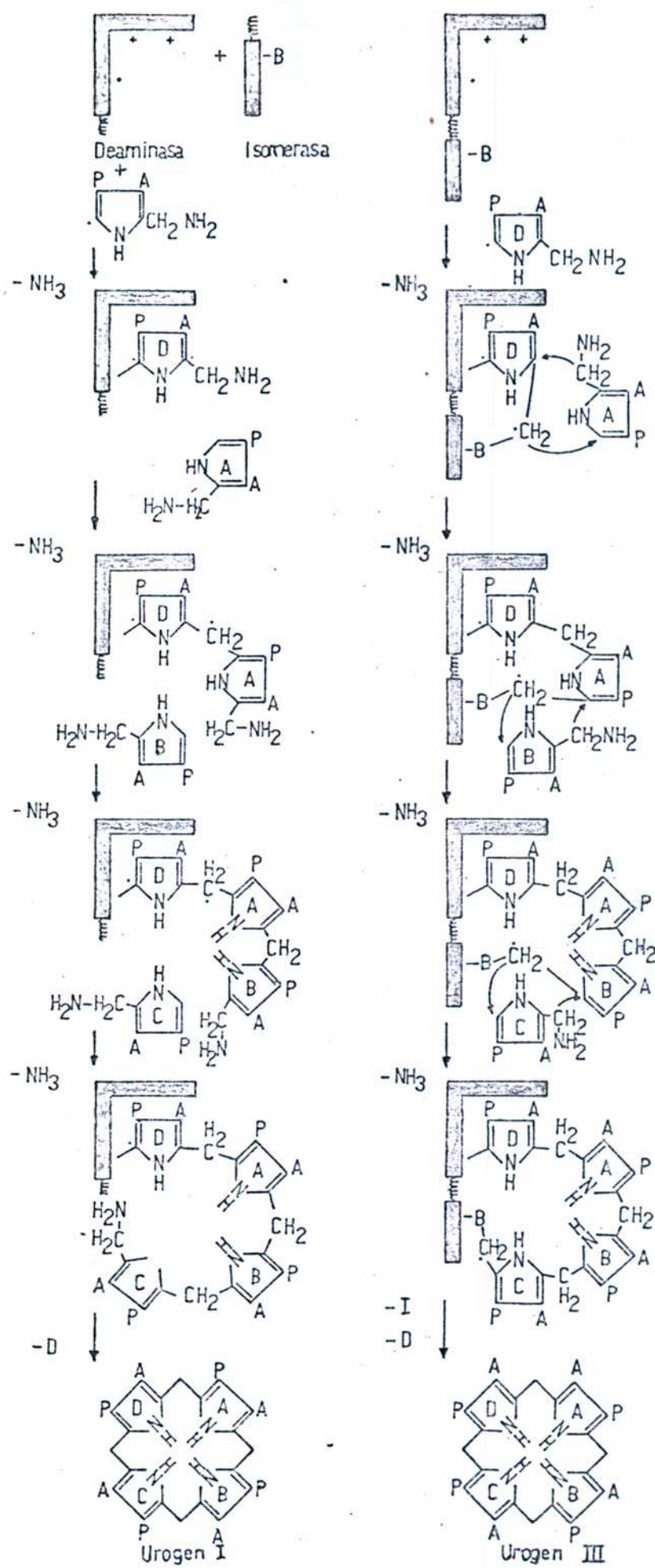


FIGURA II.7.: Mecanismo propuesto para la formación enzimática de uroporfirinógenos I y III a partir de PBG.

La decarboxilasa actúa específicamente sobre los restos acético ; pero no selecciona el tipo isomérico, ya que es capaz de decarboxilar los cuatro isómeros posibles del uroporfirinógeno, aunque con diferente velocidad, III > IV > II > I. Además puede catalizar la decarboxilación sobre los distintos isómeros de los demás porfirinógenos con 7, 6 y 5 carboxilos. La afinidad de la enzima parece disminuir cuando la cantidad de grupos carboxilos del sustrato es menor (Smith y Francis, 1979).

Es una enzima particularmente anaeróbica, de manera que el oxígeno la inhibe significativamente; aunque se ha demostrado que la acción del oxígeno se debe a una oxidación de sus sustratos, los porfirinógenos, no puede descartarse un efecto directo sobre la enzima misma. Es termolábil y sulfhidrúlica, siendo activada o protegida por  $\beta$ -mercaptoetanol o GSH, e inhibida por metales pesados y bloqueantes de restos sulfhidrúlicos.

En cuanto a la forma de acción de la decarboxilasa todavía no ha podido dilucidarse el mecanismo mismo de la reacción de decarboxilación del resto acetato a metilo; sólo se ha conseguido establecer cuál es la ruta de decarboxilación de uroporfirinógeno III a coproporfirinógeno III (Jackson y col, 1976). La decarboxilación se inicia en el resto acetato del anillo D del urogen III, ubicado sobre la enzima, prosiguiendo luego sobre los otros restos acetato de los anillos A, B y C hasta formar el coprogen III (Figura II.8.). Es decir, el urogen III se desplazaría sobre la superficie de la enzima en el sentido de las agujas del reloj.

Esta enzima actúa también sobre el urogen I convirtiéndolo en coprogen I por cualquiera de las dos únicas rutas posibles (Jackson y col, 1977) (Figura II.9.).

Estudios sobre las propiedades cinéticas de la decarboxilasa de glóbulos rojos (Taylor y Roenigk, 1975) han demostrado una inhibición recíproca en la decarboxilación de porfirinógenos de la serie III por porfirinógenos de la serie I con el mismo número de carboxilos y una inhibición no recíproca en la decarboxilación de urogen III por firiaporfirinógeno III y pentaporfirinógeno III. Los autores sugieren que los porfirinógenos de ambas series isoméricas con el mismo número de carboxilos son decarboxilados en el mismo centro activo, mientras que la decarboxilación secuencial de urogen III a coprogen III ocurre en cuatro sitios diferentes.

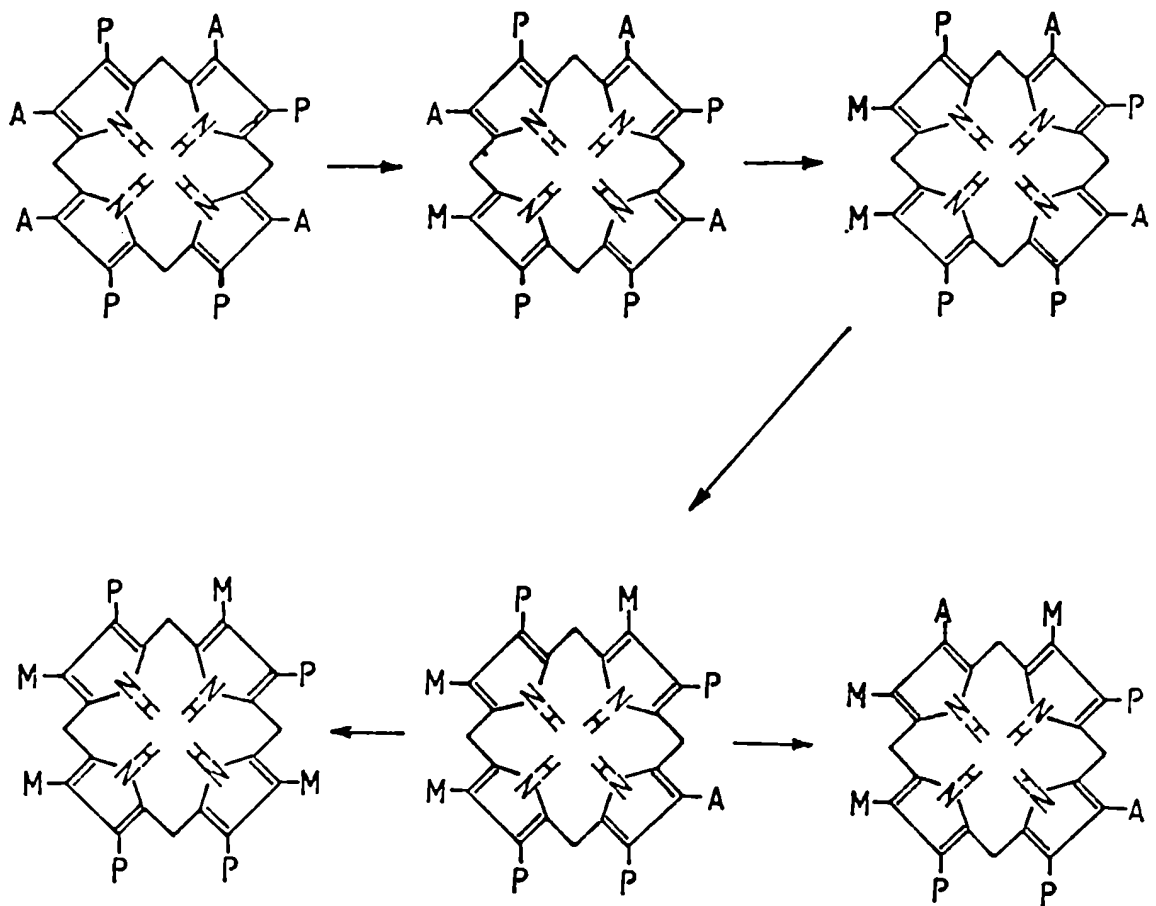


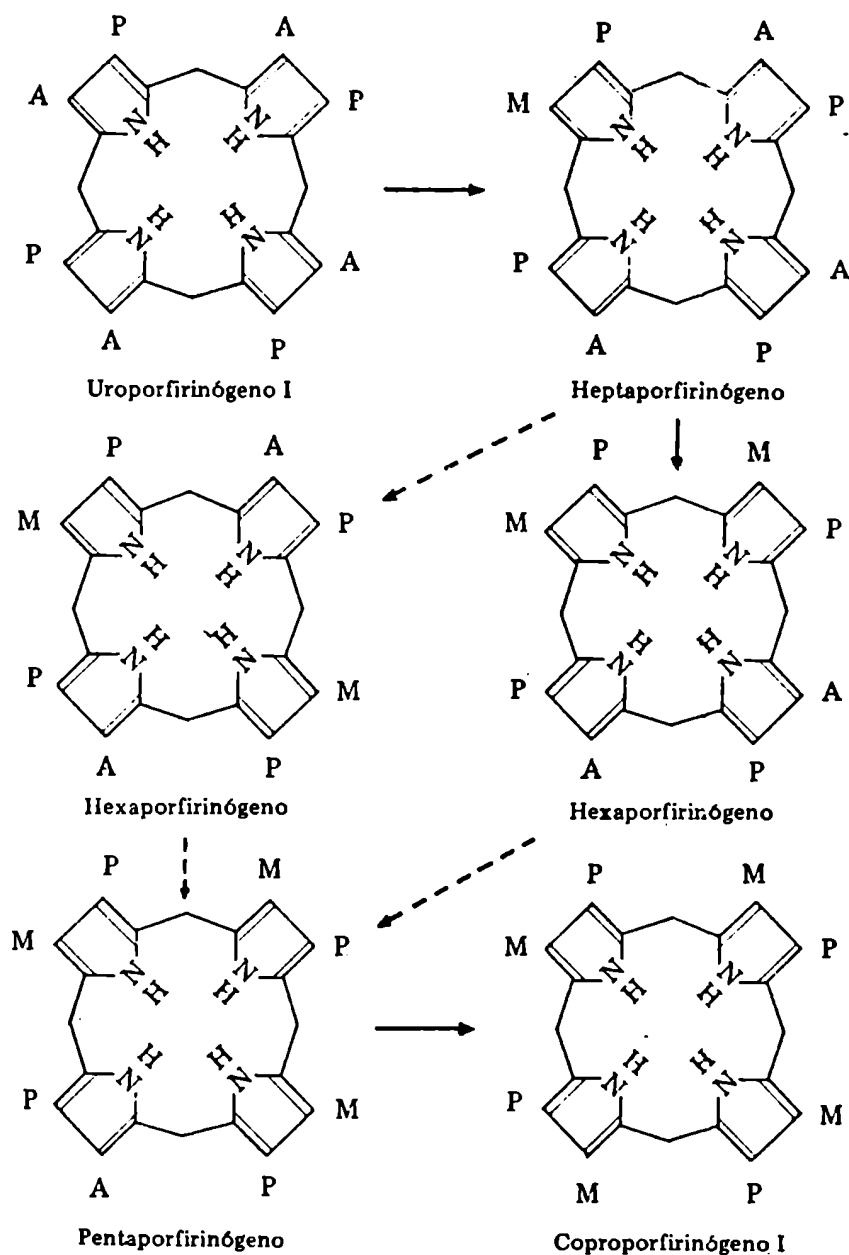
FIGURA II.8.: Ruta normal para la decarboxilación enzimática del uroporfirinógeno III a coproporfirinógeno III.

Los valores obtenidos en la determinación de  $K_m$  y  $V_{max}$  indican que la enzima tiene mayor afinidad por los isómeros de la serie III que por los de la serie I.

### II.3.6. Síntesis de Protoporfirinógeno : Coproporfirinogenasa

La coproporfirinogenasa (CPGasa), coproporfirinógeno oxidasa o coprogenasa cataliza la decarboxilación oxidativa de los dos restos propionato ubicados en los anillos A y B del coproporfirinógeno III en dos grupos vinilo, por eliminación de dos moléculas de  $CO_2$  y dos de hidrógeno, con la consecuente forma-

ción de protoporfirinógeno IX (Figura II.10.).



**FIGURA II.9.:** Rutas alternativas y simultáneas para la decarboxilación enzimática del uroporfirinógeno I en coproporfirinógeno I.

La coprogenasa es una enzima altamente específica para el coproporfirinógeno III, por lo cual sólo se encuentra en la naturaleza la protoporfirina IX. No utiliza los coproporfirinógenos I y II como sustratos, aunque *in vitro* puede emplear el isómero IV, producto de síntesis, dando origen a la protoporfirina IX.

rina XIII (Al-Hazimi y col, 1976).

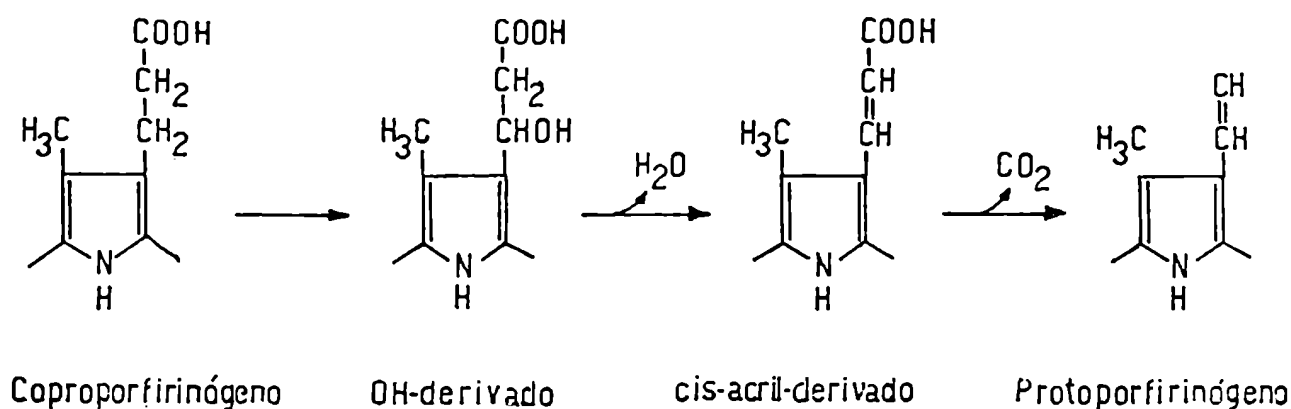


FIGURA II.10.: Mecanismo de decarboxilación oxidativa del coproporfirinógeno III a protoporfirinógeno IX.

En todos los tejidos estudiados la CPGasa es una enzima mitocondrial (Batlle y col, 1965) y en eucariotes tiene un requerimiento absoluto por el oxígeno molecular (Falk y col, 1953), el cual actuaría como aceptor de hidrógenos no pudiendo ser reemplazado por otros oxidantes. En ciertos organismos estrictamente anaeróbicos debe existir, necesariamente, algún mecanismo que lleve a la formación de protogen IX por otra vía (Mori y Sano, 1968). Tait (1969, 1972) en *Rp. spheroides* y Poulson y Polglase (1974 a) en *S. cerevisiae* detectaron actividad de CPGasa en aerobiosis y anaerobiosis; utilizando, en este último caso, un sistema constituido por ATP, L-metionina y  $Mg^{++}$  como aceptor de hidrógeno.

Recientemente, Yoshinaga y Sano (1980) purificaron la CPGasa de hígado bovino, hallando un peso molecular de 74.000 a través de filtración en gel y de 71.600 por electroforesis en SDS poliacrilamida, confirmando los datos obtenidos para hígado de rata (Batlle, y col, 1965), sugiriendo que se trata de una proteína monomérica.

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.

En 1968, Tomio y Grinstein detectaron por primera vez

una porfirina tricarboxílica en glándula de Harder, denominada harderoporfirina, cuya estructura fue confirmada por síntesis química (Kennedy y col, 1970). Este intermediario es un derivado de la coproporfirina III en el cual el resto propiónico de la posición 2 del anillo A está sustituido por un vinilo. Estos resultados han sugerido que la decarboxilación oxidativa de los restos propionato es un proceso en etapas, comenzando por el sustituyente en 2 del anillo A y siguiendo luego por el del anillo B; así la coprogenasa actuaría, análogamente a la decarboxilasa, siguiendo el sentido de las agujas del reloj.

Rimington y Tooth (1961) postularon que una acrílico porfirina podría ser el intermediario de esta reacción; se observó que el trans 2,4-diacrílico porfirinógeno no actuaba como sustrato (Sano y Granick, 1961; Batlle y Rimington, 1966); aunque aún así existía la posibilidad de que el verdadero intermediario fuera el isómero cis (Batlle y col, 1965). Posteriormente French y col (1970) aislaron de materiales biológicos la porfirina S-411 cuya estructura correspondía a una porfirina tricarboxílica con un sustituyente cis-acrilato en la posición 2 del anillo, lo cual estaría apoyando la teoría anterior.

Batlle y col (1965) propusieron que la primera etapa en este proceso era una oxidación del resto propionato a un hidroxipropionato (Figura II.10.). Sano (1966) sintetizó una mezcla de isómeros de este compuesto, comprobando su incorporación en el protoporfirinógeno utilizando extractos mitocondriales de hígado bovino como fuente enzimática.

Estudios posteriores *in vitro* (Battersby y col, 1972; Zaman y col, 1972), empleando precursores marcados, revelaron que la porfirina S-411, aparentemente, no sería un intermediario normal. Jackson y col (1976) interpretaron estos resultados sugiriendo que dicha porfirina provendría de un camino anormal y que el  $\alpha$ -hidroxipropionil derivado podría eliminar agua y decarboxilarse simultáneamente a vinilo. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que bajo control enzimático, ocurra *in vivo* la ruta esquematizada en la Figura II.10.

En un estudio reciente, Jackson y col (1980) utilizando hemolizados de eritrocitos de pollo y mitocondrias de hígado de rata como fuente enzimática, postularon que el intermediario anterior al harderoporfirinógeno sería un porfirinógeno hidroxipropiónico (Figura II.10.). Yoshin y Sano (1980) demostraron que la conversión enzimática de los grupos propionato del copro

porfirinógeno III a los dos grupos vinilo del protoporfirinógeno IX ocurre en etapas desde la posición 2 a la 4 con la formación del porfirinógeno  $\beta$ -hidroxipropionato como intermediario.

### II.3.7. Síntesis de protoporfirina: Protoporfirinógeno-oxidasa

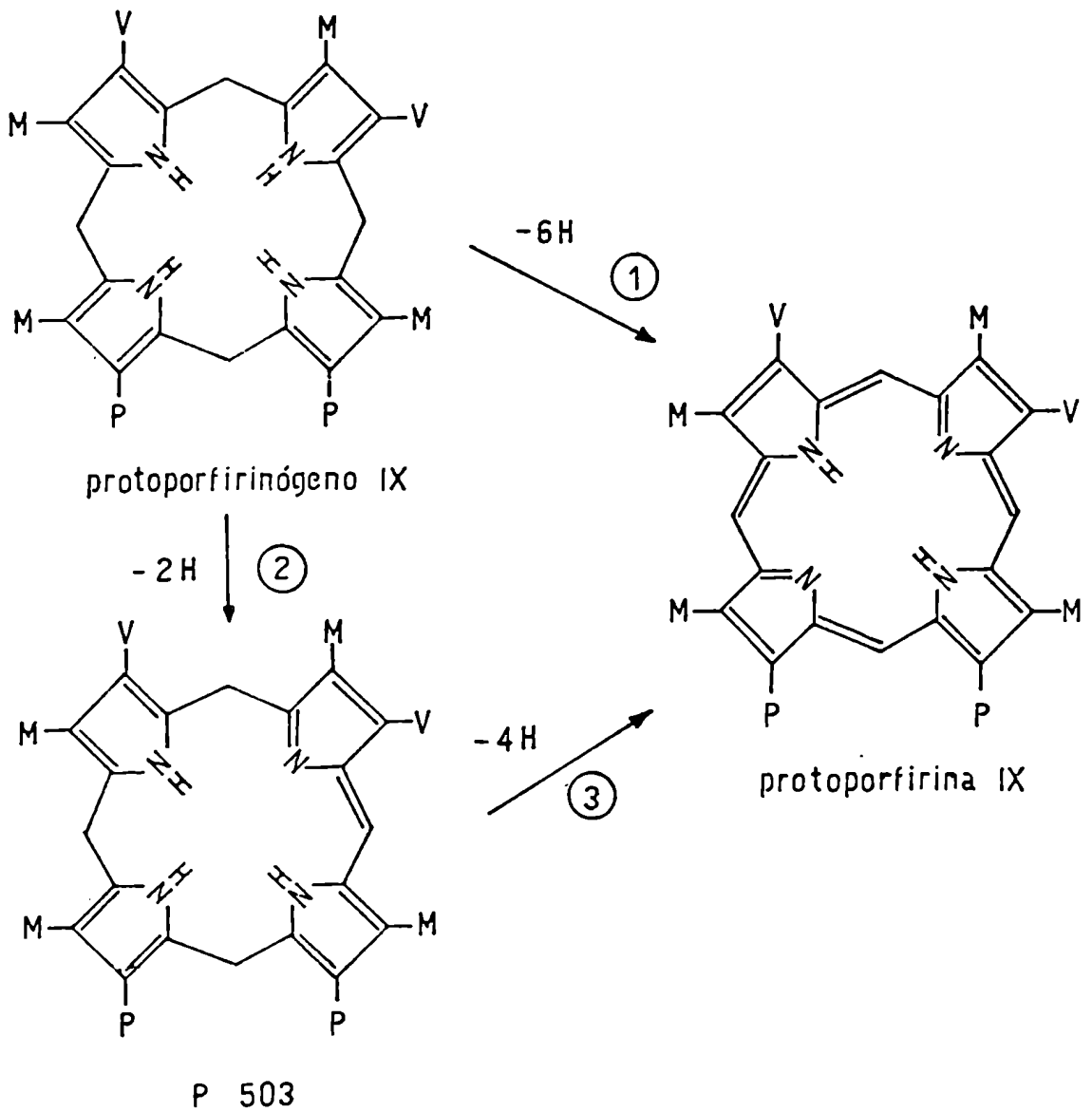
El protoporfirinógeno IX es oxidado en la mitocondria a protoporfirina IX. Esta reacción puede proceder no enzimáticamente en presencia de oxígeno molecular (Sano y Granick, 1961).

Sin embargo, Poulson y Polglase (1974 a, b; 1975) aislaron y caracterizaron una enzima mitocondrial que cataliza la oxidación de protoporfirinógeno IX a protoporfirina IX con pérdida de 6 átomos de hidrógeno. La protogen-oxidasa purificada de levaduras (Poulson y Polglase, 1974 a) y de hígado de rata (Poulson, 1976) requiere oxígeno molecular. La enzima de hígado de rata tiene un peso molecular de 35.000 (Poulson, 1976), es sulfhidrónica, aparentemente no requiere cofactores para su actividad y no la afectan los agentes quelantes. El urogen I o III, o coprogen I o III, no actúan como sustratos. En *Escherichia coli*, Jacobs y Jacobs (1975) midieron actividad aeróbica de esta enzima. Estos mismos autores (1976) demostraron luego que esta reacción podía ocurrir en condiciones anaeróbicas utilizando 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). Puede concluirse 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).

Aunque aún no se conoce su mecanismo de acción preciso, se postula que los restos sulfhidrónicos de la proteína serían muy importantes en la catálisis por su unión con los grupos vinilos del protoporfirinógeno IX y se ha sugerido que la oxidación del sustrato involucra una pérdida estereoespecífica de los átomos de hidrógeno ubicados en sólo uno de los lados del plano del tetrapirrol (Jackson y Games, 1975).

La reacción ocurre en dos etapas. En la primera se forma el intermediario tetrahidroprotoporfirina IX, un pigmento con

un máximo de absorción a 503 nm (P-503). El segundo paso, que requiere la remoción de 4 hidrógenos, está catalizado por la protogen oxidasa (Figura II.11.).



① y ③ Protogen oxidasa

② autooxidación

FIGURA II.11.: Esquema de la formación de protoporfirina IX a partir de protoporfirinógeno IX



### II.3.8. Síntesis de hemo: Ferroquelatasa

La enzima final en el camino del hemo, ferroquelatasa (Rimington, 1958) o hemo sintetasa, se encuentra fuertemente asociada a la membrana interna de la mitocondria (McKay y col, 1969) y cataliza la inserción de hierro ferroso en el anillo de la protoporfirina IX.

Es una enzima particulada que se encuentra en las mitocondrias de células animales, en cloroplastos de vegetales y en los cromatóforos de bacterias fotosintéticas.

En 1961, Schwartz y col, demostraron que la incorporación de hierro ferroso en la protoporfirina se veía facilitada por la presencia de globina, y que el producto final de la reacción, caracterizado por electroforesis y cromatografía, era 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 (Nishida y Labbe, 1959).

La eliminación de lípidos inactiva la enzima y el agregado de fosfolípidos restablece dicha actividad al valor normal (Yoshikawa y Yoneyama, 1964; Sawada y col, 1969).

La ferroquelatasa es una lipoproteína (Mazanowska y col, 1969); se ha encontrado que el agregado de solventes orgánicos aumenta su actividad (Mazanowska y col, 1966), posiblemente facilitando el acceso del sustrato al sitio activo. Takeshita y col (1970) postularon que un fosfolípido cargado participaría en la activación de la enzima.

## REFERENCIAS

- Al-Hazimi, H.M.; Jackson, A.H. & Ryder, D. (1976) J. Chem. Soc. Chem. Comm., 188.
- Alvares, A.P.; Leigh, S.; Cohn, J. & Kappas, A. (1972) J. Exp. Med. 135, 1406.
- Aragonés, A.; García, R.; San Martín de Viale, L.; Tomio, J.M. & Grinstein, M. (1972) An. Asoc. Qca. Arg. 60, 239.
- Bagdasarian, M. (1958) Nature 181, 1399.
- Barreiro, O.L.C. de (1969) Biochim. Biophys. Acta 178, 412.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1964) Biochim. Biophys. Acta 62, 197.
- 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.
- Batlle, A.M. del C. & Stella, A.M. (1978) Int. J. Biochem. 9, 864.
- Batlle, A.M. del C.; Benson, A. & Rimington, C. (1965) Biochem. J. 97, 731.
- Batlle, A.M. del C.; Ferramola, A.M. & Grinstein, M. (1967) Biochem. J. 64, 80.
- Batlle, A.M. del C.; Llambías, E.B.C.; Wider de Xifra, E.A. & Tigier, H.A. (1975) Int. J. Biochem. 6, 591.
- 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.
- Battersby, A.R.; Baldas, J.; Collins, J.; Grayson, D.; James, K. & Mc Donald, E. (1972) J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1265.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Gustafson-Potter, K.E.; Matcham, G.W.J. & Mc Donald, E. (1979) J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1155.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.I.R.; Matcham, G. & Mc Donald, E. (1980) Nature 17, 5759.
- Bevan, D.R.; Bodlaender, P. & Shemin, D. (1980) J. Biol. Chem. 255, 2030.

- Bloch, K. & Rittenberg, D. (1945) J. Biol. Chem. 159, 45.
- Burton, G. ; Fagerness, P.E.; Hosozawa, S.; Jordan, P.M. & Scott, I.A. (1979) J. Chem. Soc. Chem. Comm., 202.
- Calissano, P.; Bonsignore, D. & Cartasegna, C. (1966) Biochem. J. 101, 550.
- Carell, E.F. & Kahn, J.S. (1964) Arch. Biochem. Biophys . 108, 1.
- Collier, H.B. (1971) Clin. Biochem. 4, 222.
- Cha, S. & Park, R. (1964) J. Biol. Chem. 239, 1968.
- Ebert, P.S.; Hess, P.A.; Frykholm, B.C. & Tschudy, D.P. (1979) Biochem. Biophys. Res. Comm. 88, 1382.
- Elder, G.H. (1982) Abstracts - VIIth Tetrapyrrole Meeting. Southampton.
- Elder, G.H. & Tovey, J.A. (1977) Biochem. J. 5, 1470.
- Falk, J.; Dresel, E. & Rimington, C. (1953) Nature 172, 292.
- Finelli, V.N.; Klauder, D.S.; Karaffa, M.A. & Petering, H.G. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 303.
- French, J.; Nicholson, D. & Rimington, C. (1970) Biochem. J. 120, 393.
- Frydman, R.B. & Feinstein, G. (1974) Biochim. Biophys. Acta 350, 358.
- Gibson, K.D.; Mattew, M.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1961) Nature 192, 204.
- Granick, S, & Mauzerall, D. (1958 ) J. Biol. Chem. 232, 1119.
- Granick, J.L.; Sassa, S.; Granick, S.; Levere, R.D. & Kappas, A. (1973) Biochem. Med. 8, 149.
- Heikel , T.; Lockwood, W. & Rimington, C. (1958) Nature, London 182, 313.
- Hoare, D.S. & Heath, H. (1958) Biochem. J. 69, 51.
- Jackson, A.H. & Games, D.E. (1975) Ann. N.Y. Acad. Sci. N.Y. 244, 591.
- Jackson, A.H.; Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Evans, N.; Games, D.E.; Matlin, S.A.; Elder, 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.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. & Seehra, J.S. (1979) FEBS Letters 104, 364.
- Jordan, P. & Seehra, J.S. (1980) J.C.S. Chem. Comm., 240.
- Jordan, P.; Burton, G.; Nordlov, H.; Scheneider, M.; Pryde, L. & Scott, I. (1979) J. Chem. Soc. Chem. Comm., 204.
- Kato, R. (1967) Jpn. J. Pharmacol 17, 56.
- Kaufman, S. (1951) en "Phosphorus metabolism" (Ed. Mc Elvery, W.) Glass Baltimore, U.S.A., Vol 1, p. 370.
- Kennedy, G.; Jackson, A.H.; Kenner, G. & Suckling, G. (1970) FEBS Letters 6, 9.
- Kowalski, E.; Danciewicz, A.M. & Szot, Z. (1957) Bull. Acad. Polon. Sci. II 5, 223.
- Kushner, J.P.; Steinmuller, D.P. & Lee, G.R. (1975) J. Clin. Invest. 56, 661.
- Labbe, R.F.; Kurumada, T. & Onisawa, J. (1965) Biochim. Biophys. Acta 3, 403.
- Lockwood, W. & Rimington, C. (1957) Biochem. J. 67, 8.
- Lohr, J.B. & Friedman, H.C. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 908.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 a) Biochim. Biophys. Acta 220, 553.

- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 b) FEBS Letters 9, 180.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 c) FEBS Letters 6, 285.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971) Biochem. J. 121, 327.
- Llambías, E.B.C.; Locascio, G. & Batlle, A.M. del C. (1971) Anal. As. Q. Arg. 59, 271.
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1141.
- Mazanowska, A.M.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1966) Biochem. J. 98, 117.
- Mazanowska, A.M.; Danciewicz, A.M.; Malinowska, T. & Kowalski, E. (1969) Eur. J. Biochem. 7, 583.
- McKay, R.; Druyan, R.; Getz, G.S. & Rabinowitz, M. (1969) Biochem. J. 114, 455.
- Moore, M.R.; Beattie, A.D.; Thompson, G.G. & Goldberg, A. (1971) Clin. Science 40, 81.
- Mori, M. & Sano, S. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 610.
- 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. & Yano, Y. (1968) Clin. Chim. Acta 19, 319.
- Nandi, D.L. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 142, 157.
- Nandi, D.L. & Shemin, D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 1236.
- Nandi, D.L. & Waygood, E.R. (1965) Can. J. Biochem. 43, 1605.
- Nandi, D.L. & Waygood, E.R. (1967) Can. J. Biochem. 45, 327.
- Neuberger, A. & Turner, J.M. (1963) Biochim. Biophys. Acta 67, 342.
- Nishida, G. & Labbe, R.F. (1959) Biochim. Biophys. Acta 31, 519.
- Nishimura, J.S. & Grinnel, F. (1972) en "Advances in Enzymology" (Ed. Meister), Wiley and Son. Chichester, Vol. 36, 186.
- Noguchi, T. & Mori, R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10335.
- Poulson, R. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3730.

- Poulson, R. & Polglase, W.J. (1974 a) J. Biol. Chem. 249, 6367.
- Poulson, R. & Polglase, W.J. (1974 b) FEBS Lett. 40, 258.
- Poulson, R. & Polglase, W.J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1269.
- Rimington, C. (1958) Rev. Pure Appl. Chem. 8, 129.
- Rimington, C. & Tooth, B. (1961) J. Biochem. Tokyo 49, 456.
- Romeo, G. & Levin, E. (1971) Biochim. Biophys. Acta 230, 330.
- Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1977) Int. J. Biochem. 8, 277.
- Rossetti, M.V.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1977) Int. J. Biochem. 8, 781.
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969) FEBS Letters 3, 223.
- Sano, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5276.
- Sano, S. & Granick, S. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1173.
- Sawada, H.; Takeshita, M.; Sugita, Y. & Yoneyama, Y. (1969) Biochim. Biophys. Acta 178, 145.
- Schwartz, H.C.; Goldsmith, R.; Hill, R.L.; Cartwright, G.E. & Wintrobe, M.M. (1961) J. Clin. Invest. 40, 188.
- Shemin, D. & Kumin, S. (1952) J. Biol. Chem. 198, 827.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1945) J. Biol. Chem. 159, 567.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1951) J. Biol. Chem. 192, 315.
- Shemin, D.; Russell, C.S. & Abramsky, T. (1955) J. Biol. Chem. 215, 613.
- Shetty, A.S. & Miller, G.W. (1969) Biochem. J. 114, 331.
- Shigesada, K. (1972) J. Biochem. Tokyo 71, 961.
- Smith, A.G. & Francis, J.E. (1979) Biochem. J. 183, 455.
- Tait, G. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 37, 116.
- Tait, G. (1972) Biochem. J. 128, 1159.
- Takeshita, M.; Sugita, Y. & Yoneyama, Y. (1970) Biochim. Biophys. Acta 202, 544.
- Taylor, J.S. & Roenigk, H. (1975) en "Porphyrins in Human Diseases" (Ed. M.D. ) 1st. Int. Prophyrin Meet. Freiburg/Br. Karger, Basel, 328.

- Tephly, T.R. (1978) en "Heme and Hemoproteins" Handbook of Experimental Pharmacology (Ed. F. DeMatteis and W.M. Aldridge) Springer-Verlag, Berlin, Vol 44, p. 81.
- 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. & Grinstein, M. (1968) Eur. J. Biochem. 6, 80.
- Tomio, J.M.; Tuzman, V. & Grinstein, M. (1968) Eur. J. Biochem. 6, 84.
- Tomio, J.M.; García, R.C.; San Martín de Viale, L.C. & Grinstein, M. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198, 353.
- Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1979) Biochim. Biophys. Acta 570, 167.
- Varticovski, L.; Kushner, J.P. & Burnham, B.F. (1980) Int. J. Biochem. 12, 739.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1973) Enzyme 16, 128.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1976) en "Studies on Soybean Callus Succinyl CoA Synthetase. Reaction mechanism" en "Porphyrins in human diseases" (Ed. M.Doss ) Karger, Basel, p. 25.
- Wider de Xifra, E.A. & Tigier, H. (1971) Enzymologia 41, 217.
- Yamasaki, H. & Moriyama, T. (1971) Biochim. Biophys. Acta 227, 698.
- Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4722.
- Yoshikawa, H. & Yoneyama, Y. (1964) en "Iron Metabolism" (Ed.F.Gross) Springer-Verlag, Berlin, p. 24:.
- Zaman, S.; Abboud, M. & Akhtar, M. (1972) J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1263.

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS

	Página
III.1. Manifestaciones de los mecanismos de regulación	50
III.2. Mecanismos de control	51
III.2.1. Control por retroinhibición y por re <u>presión</u> enzimática del ALA-S	51
III.2.1.1. Control por cambios en la <u>ac</u> tividad del ALA-S	51
III.2.1.2. Control por cambios en la cantidad de ALA-S	52
III.2.1.3. Regulación por Hemo de la translocación del ALA-S <u>des</u> de el citosol a la mitocon <u>dria</u>	55
III.2.1.4. Pool de hemo regulatorio	56
III.2.2. Control por localización tisular y celular	58
III.2.2.1. Especialización tisular	59
III.2.2.2. Compartimentalización <u>intra</u> celular	59
III.2.3. Control por otros constituyentes del medio ambiente	61
III.2.3.1. Oxígeno	61
III.2.3.2. Iluminación	61
III.2.3.3. Efecto ATP	61
III.2.4. Control por interconexión con otros <u>ca</u> minos metabólicos	62
Referencias	69



### III. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PORFIRINAS

#### III.1. MANIFESTACIONES DE LOS MECANISMOS DE REGULACION

La biosíntesis del hemo es un proceso complejo y fundamental para la vida en nuestro planeta. En contraste con la gran importancia biológica de los hemos, no se conoce rol fisiológico alguno para las porfirinas libres y sus precursores específicos ALA y PBG, y sólo se los considera productos intermedios en este camino metabólico; en condiciones normales, la cantidad de dichos compuestos que se acumula o excreta es muy pequeña; esta biosíntesis se lleva a cabo con un rendimiento del orden del 95%; de manera que diariamente, de la producción de hemoglobina sólo se excretan, entre precursores y porfirinas, apenas un 5%. Esta notable eficiencia es el resultado de la existencia de una serie de controles estrechamente ligados que, sin embargo, cuando fallan, como ocurre en las porfirias, conduce a la síntesis de cantidades elevadas de intermediarios del camino biosintético del hemo, con serias consecuencias para el organismo (Batlle y col, 1981).

La alta concentración de precursores y/o intermediarios que puede alcanzarse cuando no actúan los mecanismos de regulación, demuestra la gran capacidad potencial de trabajo de las enzimas responsables de la síntesis de tetrapirroles, cuando éstas pueden funcionar libremente, y enfatiza la necesidad de la existencia de sistemas de control en favor de la economía y salud de la célula.

En los organismos fotosintéticos que sintetizan derivados de hemo y clorofila y en los cuales la concentración de estos últimos pigmentos es cien veces mayor que la del hemo, la situación es análoga. Es decir, necesariamente deben funcionar mecanismos regulatorios capaces de mantener un flujo del intermediario común, la protoporfirina, diversificado luego hacia los diferentes productos finales, a la velocidad apropiada. Aparentemente las ramas del hierro y del magnesio están controladas independientemente aunque inter-relacionadas, ya que bajo ciertas circunstancias se puede reprimir la síntesis de clorofila, sin afectar la síntesis de hemo (Batlle y col, 1981).

### III.2. MECANISMOS DE CONTROL

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

Los dos primeros mecanismos están vinculados, de manera que se considerarán simultáneamente.

#### III.2.1. Control por retro-inhibición y por represión enzimática del ALA-S

La síntesis de tetrapirroles está controlada principalmente por cambios en la actividad de la enzima ALA-S, considerada como la primera enzima de este camino metabólico. Es decir, la cantidad de hemo sintetizada depende de la actividad del ALA-S, por lo tanto esta enzima es limitante, y como tal desempeña un papel fundamental en la regulación de esta secuencia biosintética.

Hay tres mecanismos por los cuales puede controlarse la cantidad de hemo formado a través de la enzima ALA-S: uno involucra cambios en su actividad, otro cambios en la cantidad de enzima presente (Batlle y col, 1981) y un último que regula la translocación de la enzima desde el citosol a la mitocondria (Ohashi y Kikuchi, 1972).

Así el hemo libre o fácilmente intercambiable, constituye lo que se ha denominado como "pool de hemo regulatorio" y sería el responsable del control entre la velocidad de formación y degradación del hemo (Granick y col, 1975).

##### III.2.1.1. Control por cambios en la actividad del ALA-S

Como ya se mencionó en la célula existen varios mecanismos que pueden controlar la actividad de una enzima.

En un gran número de caminos metabólicos, se encontró que el producto final de una dada secuencia ejerce un efecto inhibitorio sobre la primer enzima del camino. Este tipo de control se conoce como control por "feed-back" o control por retro-inhibición o control por producto final.

Este mecanismo de control rápido es uno de los que opera en la biosíntesis del hemo. La primer prueba del funcionamiento de este sistema de control provino de los estudios de Lascelles (1964), quien demostró que cuando *Rp. spheroides* se hacía crecer en un medio deficiente en hierro, se acumulaban grandes cantidades de coproporfirina. El agregado del metal corregía el problema, postulándose que en esta secuencia metabólica el hierro actuaba promoviendo la síntesis del producto final hemo, que a su vez actuaba inhibiendo la primer enzima, el ALA-S (Figura III.1.I). Esta hipótesis fue confirmada cuando se encontró que bajas concentraciones de hemo o hemina, del orden de 0,1  $\mu$ M, eran capaces de provocar una marcada y específica inhibición del ALA-S tanto en *Rp. spheroides* como en otros tejidos. Un tipo de inhibición similar, operaría en el hombre y explicaría la acumulación de porfirinas en eritrocitos, observada en la anemia por deficiencia de hierro (Rimington, 1966).

#### III.2.1.2. Control por cambios en la cantidad de ALA-S

Además de la inhibición por producto final, se ha demostrado que muchos sistemas son sensibles al control por represión. En este caso, un control genético de la síntesis de ALA-S, dependiente de DNA, regula el nivel de ALA-S en la célula. El mecanismo que se ha postulado para explicar la síntesis de ALA-S y su control se basa en la conocida hipótesis de Jacob-Monod (Figura III.1.R.) (Rimington, 1966).

En el esquema propuesto por Granick y Levere (1964) se tiene en cuenta en particular el hecho experimental de que la síntesis de hemo se encuentra reprimida en la mayoría de los tejidos, por cuanto sus requerimientos son generalmente bajos y además, que el mismo hemo actúa como co-represor de su propia síntesis.

El gen estructural, una porción del DNA cromosómico del operón hemo, que lleva la información para la síntesis del ALA-S,

se activa por medio de un gen operador, que a su vez responde a la presencia de un represor activo; éste actúa normalmente sobre el gen operador, reprimiéndolo, y deteniendo entonces la producción del RNA-mensajero, que codifica la enzima, y por ende interrumpiendo su síntesis. Este mecanismo de represión de síntesis enzimática, constituye un sistema de control lento.

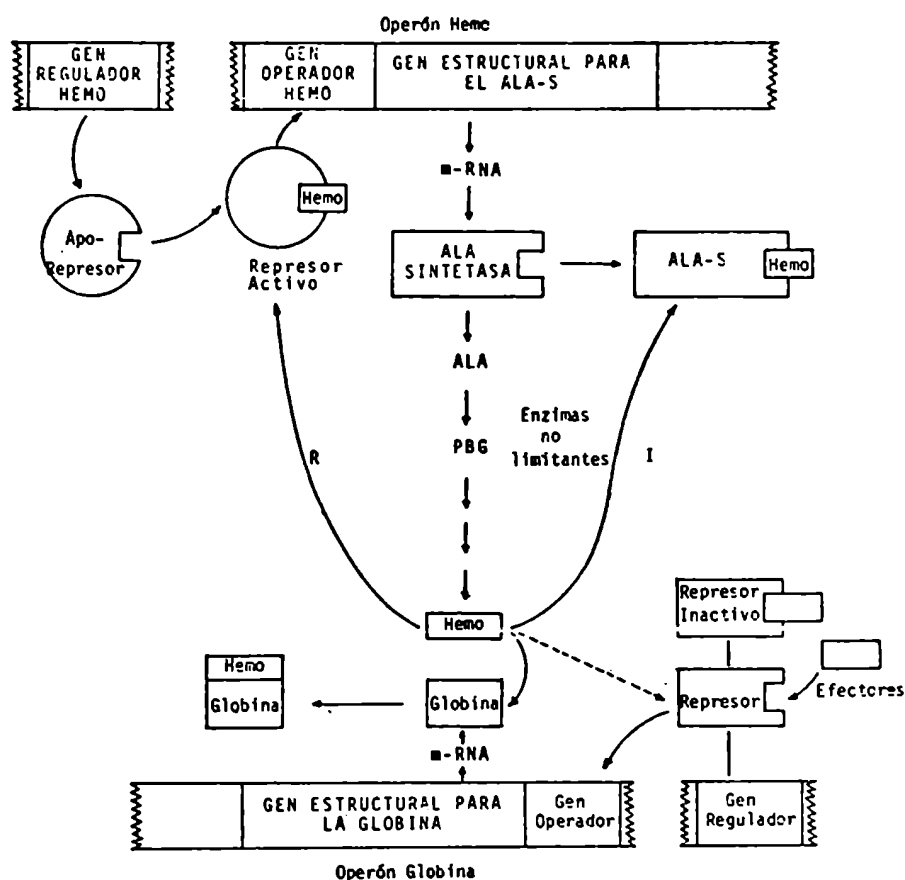


FIGURA III.1.: Mecanismo de regulación de la biosíntesis del hemo; I: por inhibición feed-back del ALA-S; R: por represión de síntesis proteica del ALA-S. Su coordinación con un hipotético esquema de control de la síntesis de hemoglobina y globina.

El represor activo se forma por la unión de un apo-represor proteico, producido por el gen estructural del operón hemo, y un co-represor que, en este caso, como se mencionara, se postula que es la molécula del hemo.

Cuando no hay exceso de hemo, no tiene lugar la conjugación del mismo con el apo-represor, el sistema represor es inactivo, y por lo tanto no actúa sobre el gen operador, de manera que se dispara o recomienza la síntesis de ALA-S, que se llevará a cabo a máxima velocidad (Figura III.1.).

Resumiendo entonces 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.

Este mecanismo de control genético de la biosíntesis del hemo por represión ha sido demostrado en varios tejidos. El agregado de hemina en concentraciones del orden de 10  $\mu$ molar a cultivos en crecimiento de *Rp. spheroides*, reprime completamente la síntesis del ALA-S (Lascelles, 1964) y se acepta que un mecanismo análogo opera en organismos superiores (Rimington, 1966).

Por otra parte, la utilización del hemo por las distintas hemoproteínas debe encontrarse, de alguna manera, muy bien coordinada con la formación de sus componentes proteicos específicos. Por ejemplo, el monómero de la hemoglobina contiene hemo y globina en la relación 1:1. Estudios efectuados sobre la síntesis de globina y hemo en reticulocitos y médula de conejo, han demostrado que existe un paralelismo entre ambos procesos, comprobándose que un exceso de hemo inhibe su propia síntesis por los mecanismos ya descritos; pero por otro lado estimula la síntesis de globina.

Se postula (Figura III.1.) que la entrada de sustancias efectoras en las células eritroides, posiblemente eritropoyetina o metabolitos de células vecinas o aún el mismo hemo, transforman el represor activo, en un represor incapaz de ejercer su acción sobre el gen operador de la globina, y en consecuencia comienza la síntesis de globina, que utiliza el hemo libre disponible para la formación de la hemoglobina. Como resultado de esta conjugación queda menos hemo disponible, de manera que el represor del gen operador hemo pierde actividad y a su vez se reinicia la síntesis de ALA-S y hemo.

Para explicar la relación 1:1 de la globina en el monómero de la hemoglobina se propone que la globina no se libera de los polisomas hasta que no se ha enrollado correctamente alrededor del hemo (Rimington, 1966).

### III.2.1.3. Regulación por hemo de la translocación del ALA-S desde el citosol a la mitocondria

La síntesis de ALA-S hepática, puede inducirse por la administración de varias drogas; en animales esta enzima suele estar localizada en la matriz mitocondrial (Granick y Sassa, 1971). Sin embargo, Hayashi y col (1969) demostraron que tratando ratas con AIA, se acumulaba una considerable cantidad de ALA-S no sólo en la mitocondria sino también en la fracción citosólica del hígado y que la enzima presente en ambas fracciones subcelulares, se sintetizaba originalmente en los citorribosomas. Posteriormente, Nakakuki y col (1980) prepararon un anticuerpo específico contra el ALA-S citosólica purificada. Usando este anticuerpo se comprobó que tanto el ALA-S citosólica como la mitocondrial de hígado de rata eran inmunológicamente idénticas, apoyando la hipótesis de que la enzima acumulada en la fracción citosólica era un precursor de la particulada en tránsito a la mitocondria.

El ALA-S citosólica de hígado de rata se presenta como un complejo de tres proteínas diferentes; una catalíticamente activa y dos catalíticamente inactivas. Estas dos últimas parecen modular la capacidad catalítica del primer componente proteico (Ohashi y Kikuchi, 1979).

Se supone que el ALA-S citosólica pierde una o ambas proteínas moduladoras, antes o después de translocarse a la mitocondria (Ohashi y Kikuchi, 1972; Igarashi y col, 1976; Kikuchi y col, 1976; Ohashi y Kikuchi, 1977). Pero todavía es poco lo que se sabe acerca del mecanismo molecular de la translocación del ALA-S o acerca del rol de estas proteínas inactivas en el ALA-S citosólica. Se supone que la translocación intracelular del ALA-S citosólica está precedida por la liberación de las dos especies proteicas inactivas que la acompañan, presumiblemente por acción de ciertas proteasas hepáticas (Ohashi y Kikuchi, 1977).

Ohashi y Kikuchi (1972) comprobaron que la hemina inhibía la transferencia del ALA-S del citosol a la mitocondria. Esta inhibición observada *in vivo*, se vió confirmada por estudios realizados *in vitro* según los cuales la hemina estimulaba la formación del complejo del ALA-S citosólica constituido por las 3 formas proteicas, este agregado molecular producido en presen

cia de hemina, no se disociaba fácilmente en sus componentes activo y moduladores aún luego del tratamiento con tripsina. En otras palabras, aparentemente la hemina prevenía la conversión del ALA-S citosólica en fracciones de menor peso molecular haciéndola altamente resistente al ataque proteolítico (Ohashi y Kikuchi, 1977). Si aceptamos que éste es el mecanismo por el cual la hemina inhibe la translocación intracelular del ALA-S, se explicaría entonces el hecho experimental de que la administración de hemina a animales con porfiria inducida por AIA, producía una gran acumulación de ALA-S en el citosol hepático, cuya vida media era varias veces mayor (Hayashi y col, 1972). De estas experiencias puede concluirse que la hemina puede regular los niveles de ALA-S en la mitocondria no sólo por control sobre la actividad y sobre la síntesis del ALA-S, sino también sobre la translocación intracelular de la enzima.

#### III.2.1.4. Pool de hemo regulatorio

Cuatro reacciones generales compiten por el hemo en la célula hepática:

- Es necesario para la síntesis de hemoproteínas tales como los citocromos mitocondriales y la catalasa, su grupo prostético.
- Es necesario para la síntesis de los citocromos microsomales que en cambio tienen relativa baja afinidad por el hemo.
- Es utilizado por la hemo oxigenasa que lo convierte en pigmentos biliares.
- Reprime la formación del ALA-S a través de su unión a un apo-represor proteico, como ya se ha explicado.

Puede considerarse que la hemina formada en la mitocondria se mueve de acuerdo a un gradiente de afinidades crecientes. La afinidad relativa de las hemoproteínas, que compiten por el grupo hemo, pueden compararse en base a sus constantes de disociación,  $K_d$ ; ésta se define como la concentración de hemoproteína que resulta cuando se alcanza un 50% de disociación. El valor de  $K_d$  depende no sólo del tipo de hemoproteína, sino también del estado de óxido-reducción del hemo y del tipo de ligando para el hierro (Rossi-Fanelli y col, 1964). Granick y col (1975) definieron sitios de unión débiles a aquellos que tienen un  $K_d$  mayor de 10 nM.

En la Figura III.2. se ilustra el movimiento de la hemina desde la mitocondria los microsomas.

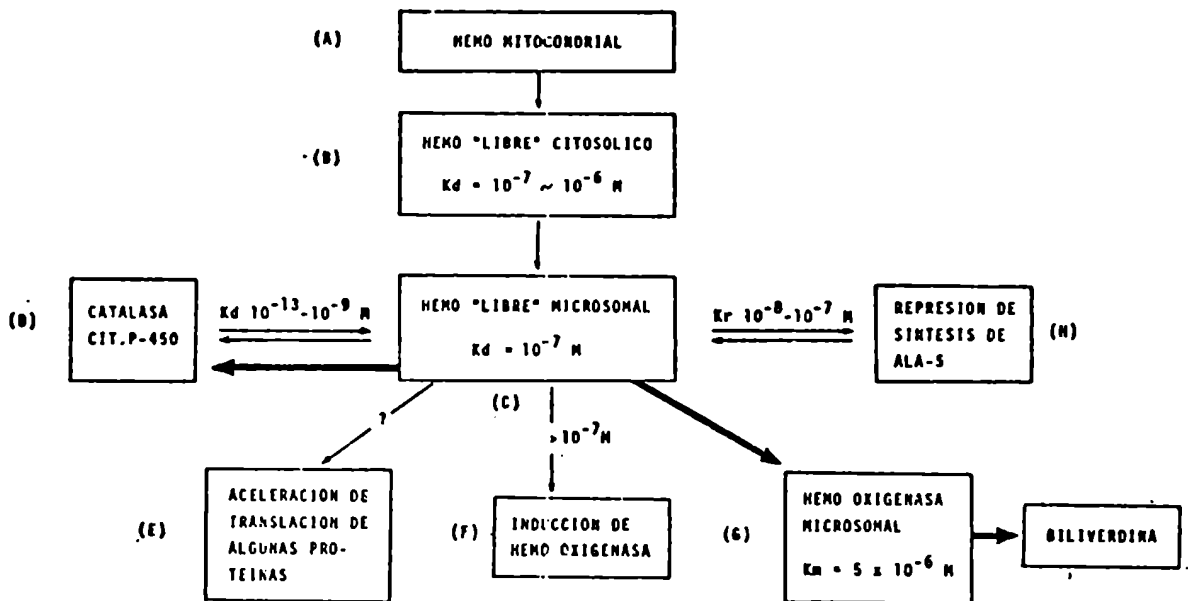


FIGURA III.2.: Mecanismos que regulan la síntesis del hemo. Afinidades de los constituyentes celulares y de las hemoproteínas por el hemo. Las flechas gruesas indican los principales caminos para el hemo. Aún no ha sido demostrada la aceleración de la translación de las proteínas en el hígado, por el hemo (E).

Yoda e Israels (1972) e Israels y col (1975), mediante estudios *in vitro*, encontraron que la presencia de proteínas citosólicas, con sitios de baja afinidad no-específicos es necesaria para que la hemina pueda salir fácilmente de la mitocondria (A) hacia el citosol (B). La hemina pasa luego a la fracción microsomal que presenta mayor afinidad (C). En los microsomas el hemo se une muy fuertemente a algunas apoproteínas recientemente sintetizadas, tales como el citocromo P-450, con alta afinidad por la hemina (Levin, 1973), formando hemoproteínas (D). Del total del hemo sintetizado y metabolizado en la célula hepática de rata, el 80% corresponde al citocromo P-450 y a la catalasa (Marver y Schmid, 1972). La hemina en los sistemas libres de células parece acelerar la síntesis de otras proteínas (E). Además actúa como un inductor específico de la síntesis de hemo-oxi



genasa cuando su concentración excede 100 nM (F). La hemina es degradada por la hemo-oxigenasa a biliverdina (G). El alto  $K_m$  de la hemo-oxigenasa (5  $\mu$ M) indica que tiene una afinidad relativamente baja por la hemina como sustrato.

La hemina aún a concentraciones tan bajas como 100 nM origina una represión del 50% en la síntesis de ALA-S (H); este efecto es de suma importancia en el control del nivel basal del hemo en la célula.

Si definimos como  $K_r$ , la concentración de hemina que reprime la síntesis de ALA-S en un 50%, se puede estimar que el nivel del hemo libre en el estado estacionario en las células del parénquima hepático, correspondería a un  $K_r$  de 100 nM (H). Este valor permitiría explicar el control de las velocidades de formación de ALA-S y del metabolismo del hemo. Así, cuando la cantidad de hemo libre producido en la mitocondria es mayor que 100 nM se producirían tres efectos, que finalmente conducirían a una disminución neta de la concentración de hemo: a) reprimiría la formación de ALA-S, b) sería más rápidamente degradado por la hemo-oxigenasa (Tenhunen y col, 1968) y c) causaría una inducción más lenta, de 2 a 7 veces, en la hemo-oxigenasa (F) (Tenhunen y col, 1970).

Por el contrario, si la concentración de hemo libre decrece por debajo de 50 nM, la síntesis de ALA-S estaría apenas reprimida o aún de-reprimida, sintetizándose más enzima y por lo tanto se produciría más hemo. De todas maneras si el hemo libre disminuye muy por debajo de 50 nM, las hemoenzimas continuarían formándose a causa de la gran afinidad de estas apoproteínas por el hemo, manteniendo la velocidad de suministro del hemo en un valor adecuado.

El hemo libre es sólo una ínfima cantidad (0,1%) del total del hemo en hemoproteínas de las células del parénquima hepático, pero como ya se describió, puede gobernar la velocidad de síntesis del ALA, compuesto limitante del camino biosintético de los tetrapirroles (Granick y col, 1975).

### III.2.2. Control por localización tisular y celular

En todos los organismos es evidente que la síntesis de tetrapirroles debe estar regulada, en última instancia en cada

tejido, a nivel de las etapas catalizadas por las enzimas involucradas en su camino biosintético.

### III.2.2.1. Especialización tisular

La localización de la síntesis de hemoglobina en los tejidos eritropoyéticos especializados en animales superiores, ha permitido explicar el problema que existiría de ocurrir una síntesis masiva de hemoglobina, simultáneamente con una síntesis mucho menor, necesaria para otras hemoproteínas esenciales como por ejemplo los citocromos. Los niveles de hemoproteínas varían considerablemente en los tejidos (Batlle y col, 1981).

Si bien no se dispone de la información completa sobre la biosíntesis de tetrapirroles en todos los tejidos, parece existir una precisa correlación entre los niveles de las enzimas de este camino biosintético y su correspondiente capacidad para formar sus hemoproteínas. Así por ejemplo, se ha determinado el nivel de algunas enzimas tales como ALA-D, comprobándose que en hígado, tejido que requiere grandes cantidades de hemo, la enzima presenta su mayor actividad.

Se considera entonces, que la concentración de las enzimas en los distintos tejidos determina o regula la cantidad de tetrapirrol formado por un tejido dado, que a su vez depende de las necesidades de hemo que dicho tejido tiene (Batlle y col, 1981).

### III.2.2.2. Compartimentalización intracelular

Del estudio de la localización celular de las enzimas de la biosíntesis de porfirinas, se sabe que determinadas etapas tienen lugar dentro de la mitocondria mientras que otras suceden en el citoplasma (Figura III.3.).

De manera que los metabolitos así formados se ven forzados a difundir de un espacio a otro, lo cual, podría constituir de por sí un mecanismo regulatorio, especialmente si algunos de estos sustratos se encontraran en ciertas etapas unidos a proteínas, con lo cual su difusión podría modificarse según el estado de la célula (Batlle y col, 1981).

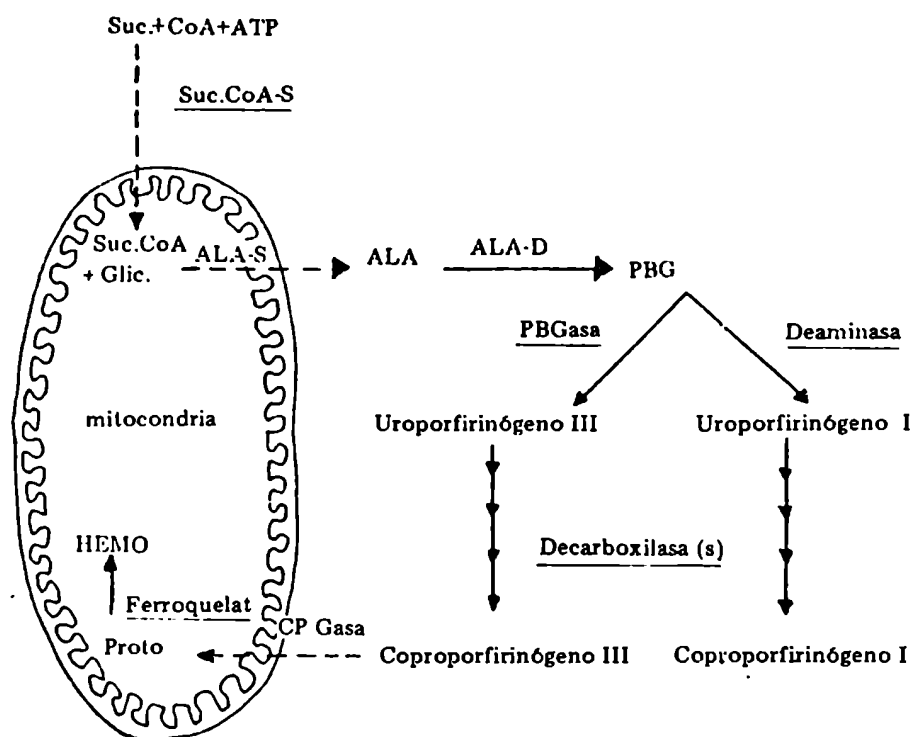


FIGURA III.3.: Localización intracelular de las enzimas involucradas en el camino biosintético del hemo.

También los niveles de óxido-reducción del medio son importantes no sólo para mantener a los tetrapirroles como porfirinógenos, que son los verdaderos sustratos de las enzimas de este camino metabólico, sino también para satisfacer los requerimientos de permeabilidad de las diferentes membranas intracelulares (Rimington, 1966).

Se ha postulado asimismo la existencia de permeasas específicas, que controlarían el pasaje de ALA y coproporfirinógeno a través de la membrana mitocondrial; sin embargo aún no hay evidencias experimentales que avalen esta hipótesis.

La concentración estacionaria de ALA dentro de la mitocondria juega un papel esencial en la regulación de la biosíntesis del hemo. Dicha concentración estará determinada por el nivel de succinil CoA generado en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

### III.2.3. Control por otros constituyentes del medio ambiente

#### III.2.3.1. Oxígeno

La tensión de oxígeno y el estado de óxido-reducción de la célula, uno de cuyos efectos ya se mencionó, influyen en forma diferencial sobre las distintas etapas de este camino metabólico, ejerciendo un papel regulatorio. Por ejemplo, la transformación de coproporfirinógeno a protoporfirinógeno depende exclusivamente del oxígeno molecular, mientras que la inserción de hierro en protoporfirina para formar el hemo está favorecida por condiciones relativamente anaeróbicas (Batlle y col, 1981).

La síntesis de tetrapirroles tanto en animales superiores como en microorganismos está significativamente influenciada por la presión de oxígeno, aunque el mecanismo de acción en los primeros es bastante complejo. En bacterias fotosintéticas el oxígeno actuaría aumentando la síntesis de un compuesto que inhibiría al ALA-S.

#### III.2.3.2. Iluminación

En bacterias fotosintéticas, las condiciones de iluminación desempeñan asimismo un papel importante en la regulación de la biosíntesis de clorofila; una elevada intensidad luminosa reprime la síntesis de ALA-S, de manera que se ha sugerido que en estos organismos los efectos de la luz y del oxígeno, descrito en el punto anterior, podrían responder a un mecanismo de control común, vinculado con la concentración de cierto carrier en la cadena de transporte de electrones y eventualmente con los niveles de ATP (Batlle y col, 1981).

#### III.2.3.3. Efecto del ATP

En cuanto al papel del ATP en la regulación de la biosíntesis del hemo, las primeras indicaciones experimentales en favor de la importancia de la concentración intracelular del ATP en el control de la síntesis de porfirinas provienen de los trabajos de Gajdos y Gajdos-Török (1969), quienes demostraron que el agregado de ATP al medio de crecimiento de *Rp. spheroides* in

hibía significativamente la síntesis de porfirinas. Paralelamente encontraron que en animales de laboratorio con porfiria inducida por ciertos agentes porfirinogénicos, los niveles de ATP estaban disminuídos; y además demostraron que la administración de ATP, ADP o AMP, corregía la porfiria. En base a sus investigaciones, los autores postularon que el efecto del ATP se ejercería a nivel del ALA-S mitocondrial mediante la formación, inducida por el ATP, de un inhibidor de naturaleza proteica. Más recientemente (Ohashi y Shinohara, 1978) se ha reportado que el ATP estimula significativamente la actividad del ALA-S citoplasmática en hígado de rata y aunque aún no se conoce cuál sería el mecanismo involucrado, se ha planteado que el ATP se uniría a un sitio alostérico de la enzima y podría provocar cambios conformacionales positivos en los sitios de unión de los sustratos glicocola y succinil-CoA, que llevarían a un aumento de la actividad del ALA-S. Es decir, se trataría de una acción del ATP diferente a la propuesta por Gajdos y Gajdos-Török (1969), aunque compatible; pues análogamente a lo discutido con respecto a los efectos del hemo, el ATP podría desempeñar un papel regulatorio dual, actuando directa o indirectamente sobre la actividad de la enzima regulatoria ALA-S.

#### III.2.4. Control por interconexión con otros caminos metabólicos

Ya se ha mencionado que los mecanismos de regulación del hemo se deben encontrar muy bien coordinados con otros procesos biosintéticos. Por ejemplo, en el estado estacionario, la concentración de ALA intramitocondrial está estrechamente vinculada con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, que regula el nivel de succinil-CoA, también vimos que el estado de óxido-reducción y la cantidad de ATP celular son otros factores importantes, enfatizando todo esto el hecho de que el sistema de regulación de esta cadena metabólica es bastante complejo e indudablemente está interrelacionado con el de otros caminos.

Es importante agregar a los ya descritos, un mecanismo adicional de control de la biosíntesis de tetrapirroles en el que se encuentran involucradas las enzimas responsables del metabolismo de sulfocompuestos. La existencia de este mecanismo de control surgió de los estudios efectuados casi simultáneamente por dos grupos de investigadores, uno en Japón y el otro

en Inglaterra. Tuboi y col (1970 a y b), pertenecientes al primer grupo mencionado, demostraron que cultivos de *Rp. spheroides* contenían dos tipos de ALA-S, llamadas fracción I y II, las cuales eran inducidas de diferente forma por variaciones del medio ambiente. Además la fracción I podía existir en dos formas: inactiva y activa. La conversión de la forma inactiva en la activa parecía deberse a alguna modificación enzimática de la molécula en la fracción I (Tuboi y Hayasaka, 1971).

Posteriormente se comprobó que en *Rp. spheroides* la conversión de la forma I inactiva a la forma activa requería la presencia de un compuesto de tipo disulfuro y un componente proteico (Tuboi y Hayasaka, 1972 a); homocistina o L-cistina podían ser los disulfuros utilizados. La enzima responsable de la activación se encontraba en alta concentración si el tejido se hacía crecer en luz y anaerobiosis (Tuboi y Hayasaka, 1972 b).

Posteriormente, Neuberger y col (1973 a) comprobaron en *Rp. spheroides* que la anulación de la activación espontánea del ALA-S en extractos libres de células causada por oxigenación del cultivo, podía atribuirse al efecto del oxígeno sobre el metabolismo de los sulfocompuestos. Los mismos autores (Neuberger y col, 1973 b) purificaron un activador del ALA-S de bajo peso molecular y obtuvieron evidencias de que dicho compuesto producía sus efectos activantes por interacción directa con el ALA-S. Dentro de los compuestos tiólicos estudiados, se comprobó que los más efectivos eran la cistina y el glutatión (GSSG). Se supuso que la cistina agregada a un extracto enzimático crudo se convertía en trisulfocistina (CySSSCy), la cual actuaría directamente sobre la enzima. El descubrimiento de polisulfuros orgánicos en extractos de *Rp. spheroides* crecidas bajo condiciones de semianaerobiosis y luz, llevó a pensar que compuestos de este tipo también controlarían la actividad de ALA-S en las células en crecimiento (Neuberger y col, 1973 c). El efecto de la tensión de oxígeno y de la intensidad de luz sobre la síntesis de bacterioclorofila en *Rp. spheroides*, observado originalmente por Cohen-Bazire y col (1957), podría deberse a cambios en la actividad del ALA-S como resultado de alteraciones en la concentración intracelular de polisulfuros. En presencia de oxígeno molecular, los polisulfuros podrían convertir a la enzima en una forma inactiva (Neuberger y col, 1973 c). A su vez la enzima de baja actividad (forma b) puede activarse de 2 a 5 veces en

presencia de concentraciones micromolares de trisulfocistina, mientras que la enzima de alta actividad (forma a) no es afectada (Sandy y col, 1975). Un extracto fresco de células crecidas semianaeróticamente a la luz contiene una mezcla de ambas formas de la enzima. Por almacenamiento de este extracto a 4 °C se produce una conversión de la forma b a la forma a, lo que explica la activación espontánea observada por Marriott y col (1969). Los extractos de células crecidas semianaeróticamente pero oxigenadas antes de ser cosechadas, contenían exclusivamente la forma b de la enzima. Cuando estos extractos eran activados por trisulfocistina se recuperaba solamente la forma a, indicando que el trisulfuro transformaba la forma b en la forma a.

Posteriormente, Wider de Xifra y col (1976) considerando los resultados obtenidos en sus experiencias, postularon un esquema para explicar el control de la actividad de ALA-S en *Rp. spheroides* (Figura III.4.). Se propuso que la disminución en el contenido celular del trisulfuro por oxigenación sería el resultado de cambios en el nivel de los sustratos para la cistationasa y rodenasa, enzimas responsables respectivamente de la síntesis y degradación de trisulfocistina; y que no se debería a cambios en las cantidades de estas enzimas. Así, la oxigenación produce un gran disturbio en el metabolismo del azufre en *Rp. spheroides*, resultando en una drástica disminución en el contenido total de glutatión y cistina más cisteína y la acumulación de homolantionina (Neuberger y col, 1973 a). Esta caída en el contenido celular de cistina produciría una disminución de la síntesis del trisulfuro por cistationasa. Se propuso además que el efecto del oxígeno sobre el metabolismo del azufre es el resultado de su inhibición sobre la reducción del sulfito y sobre la conversión de homocisteína a metionina. La inhibición de la conversión de sulfito a tiosulfato bajaría el contenido celular del tiosulfato y por lo tanto, aumentaría la degradación del trisulfuro por la rodenasa. Incluso el agregado de tiosulfato a cultivos antes de la oxigenación, previene parcialmente la inhibición del ALA-S mientras que el sulfito no es efectivo (Neuberger y col, 1973 a).

Aún se desconoce el mecanismo de la activación por trisulfuro. Este compuesto podría modificar a la enzima transfiriéndole un azufre o podría actuar catalíticamente en la formación

de un puente disulfuro intramolecular. Si el ALA-S en la forma a contiene un átomo de azufre sulfano, la conversión de la forma a en la forma b durante la oxigenación podría involucrar la transferencia del azufre sulfano a un anión tiofílico (por ejemplo sulfito) por acción de la rodenasa. Además, la conversión de la forma a en la forma b por este mecanismo y la remoción del azufre sulfano de la trisulfocistina, pueden ocurrir continuamente en la célula, en cuyo caso la oxigenación podría sólo influir sobre la velocidad de síntesis del trisulfuro y no sobre la velocidad de su degradación (Wider y col, 1976). Inoue y col (1979) purificaron de *Rp. spheroides* la enzima activante del ALA-S identificándola con la cistationasa. Confirmando este hallazgo, la cistationasa de hígado de rata podía también activar la forma b del ALA-S.

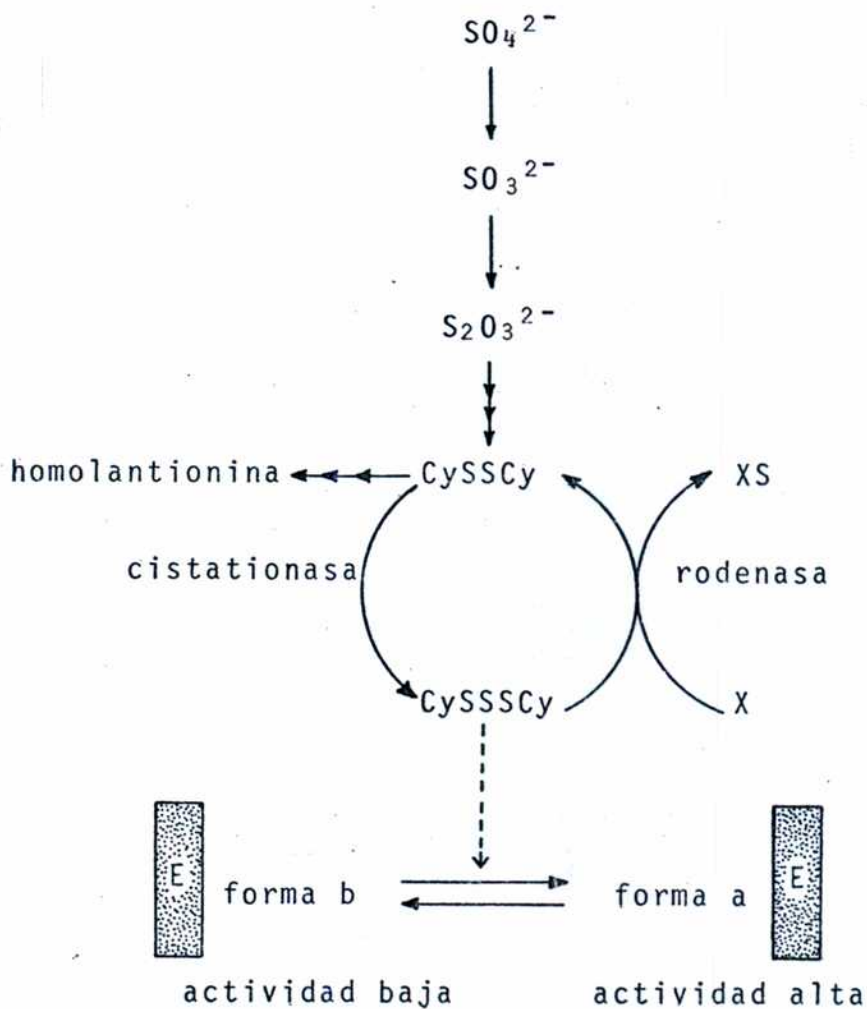


FIGURA III.4.: Esquema postulado para el control del ALA-S en *Rp. spheroides* por Wider de Xifra y col (1976)  
X: anión tiofílico



Oyama y Tuboi (1979) comprobaron que además de la enzima activante (cistationasa) y L-cistina se requería un activador de alto peso molecular (proteína reguladora) para la activación de la forma inactiva del ALA-S en *Rp. spheroides*. Estos autores propusieron el siguiente mecanismo de activación para esta enzima (Figura III.5.). La proteína reguladora es modificada por la cistationasa y L-cistina para formar una estructura trisulfocistina entre los átomos de azufre de la cistina y dos residuos cisteína de la molécula proteica. La proteína reguladora modificada convertiría la forma inactiva del ALA-S (Fib) en una forma activa por intercambio de sulfhidrilos y disulfuros intramoleculares.

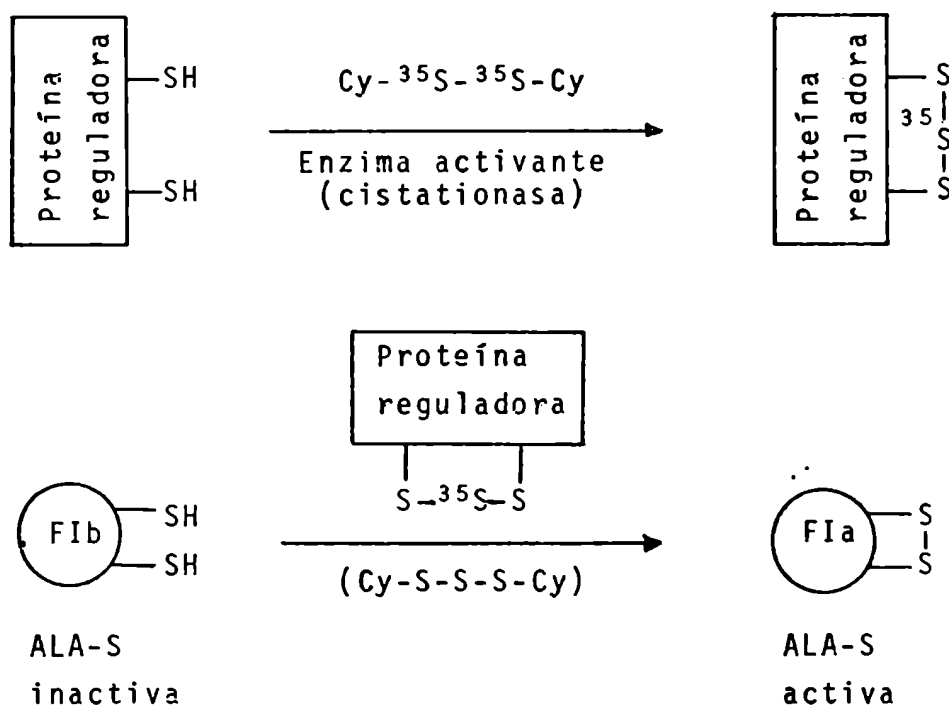


FIGURA III.5.: Mecanismo propuesto por Oyama y Tuboi (1979) para la reacción de activación del ALA-S inactiva (Fib) por una proteína reguladora en presencia de cistationasa y L-cistina.

Recientemente, Viale y col (1980) comprobaron que en *Rp. palustris* la actividad del ALA-S se encontraría controlada por la presencia de un compuesto de bajo peso molecular, aunque el mecanismo de acción de este factor regulador sería diferente al existente en *Rp. spheroides*.

Los autores proponen que en *Rp. palustris* existirían dos formas del ALA-S dependiendo de las condiciones de crecimiento; la forma de baja actividad se encuentra cuando las células crecen aeróbicamente y la forma de alta actividad cuando lo hacen en condiciones fotosintéticas.

Bajo aerobiosis se forma un cofactor el cual se une a la enzima aumentando su actividad (Figura III.6.). En condiciones anaeróbicas se forma otro compuesto o probablemente el mismo cofactor con una estructura modificada, el cual también se une al ALA-S, aunque en un sitio diferente, produciendo la forma de alta actividad.

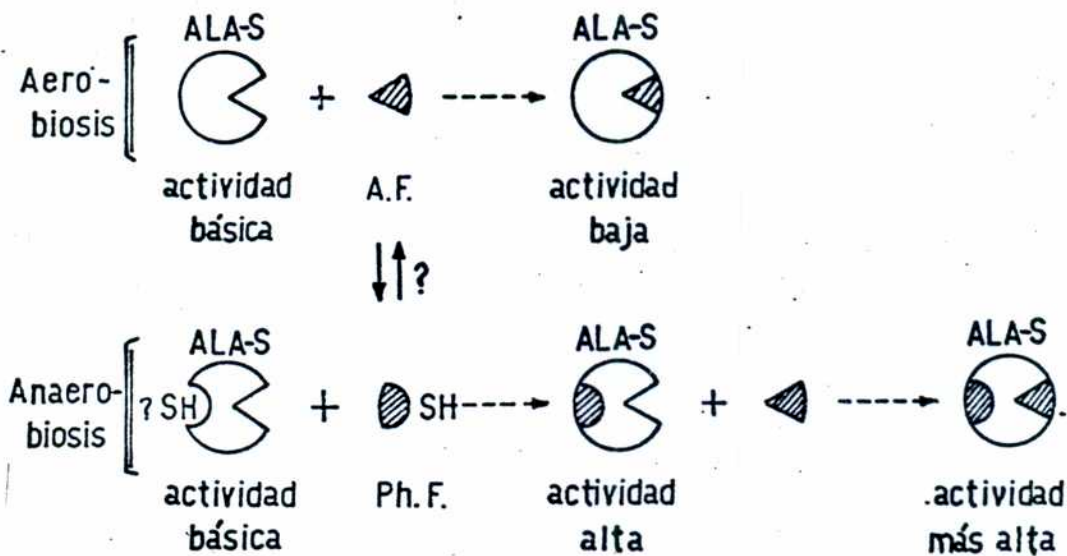


FIGURA III.6.: Esquema postulado por Viale y col (1980) para explicar la existencia de dos factores de bajo peso molecular, formados bajo condiciones aeróbicas (AF) y anaeróbicas (PhF) de crecimiento, que controlan la actividad del ALA-S en *Rp. palustris*.

La estructura de la proteína sintetizada por las células anaeróbicas puede ser apenas diferente de la enzima de las células aeróbicas, y el agregado del factor aeróbico aumentaría aún más su actividad. Por otro lado, el factor anaeróbico no podría unirse a un sitio sobre el ALA-S aeróbica para interactuar (Figura III.6.).

La oxigenación podría inactivar o prevenir la formación del factor anaeróbico; alternativamente si los grupos sulfhidrilos de la enzima son esenciales para su interacción, el oxígeno podría quizás bloquear el sitio de unión, modificandola

estructura proteica a la correspondiente de la forma de baja ac  
tividad (Viale y col, 1980).

## REFERENCIAS

- Batlle, A.M. del C.; Magnin, P.H.; Wider, E.A. (1981) en "Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, clínica y tratamiento" (Editorial Universitaria de Buenos Aires).
- Cohen-Bazire, G.; Siström, W.R. & Steiner, R.Y. (1957) J. Cell. Comp. Physiol. 49, 25.
- Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1969) en "Porphyrines et Porphyrines Biochimie et clinique" (Ed. Masson and Co.).
- Granick, S. & Levere, R.D. (1964) Progress in Haematology 4, 1.
- Granick, S. & Sassa, S. (1971) en "Metabolic Pathways" (Ed. H.J. Vogel) Academic Press, New York, 5, pp. 77.
- Granick, S.; Sinclair, P.; Sassa, S. & Grieneringer, G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 9215.
- Hayashi, N.; Yoda, B. & Kikuchi, G. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 131, 83.
- Hayashi, N.; Kurashima, Y. & Kikuchi, G. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 148, 10.
- Igarashi, J.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1976) J. Biochem. 80, 1091.
- Inoue, I.; Oyama, H. & Tuboi, S. (1979) J. Biochem. 86, 477.
- Israels, L.G.; Yoda, B. & Schacter, B.A. (1975) Ann. N.Y. Acad. Sci. 244, 651.
- Kikuchi, G.; Ohashi, A. & Hayashi, N. (1976) Ann. Clin. Res. (Helsinki) 8, 74.
- Lascelles, J. (1964) en "Tetrapyrrole biosynthesis and its regulation" (Ed. W.A. Benjamin, Inc) New York, Amsterdam.
- Levin, W. (1973) en "Microsomes and Drug Oxidations" (Eds. R.W. Estabrook, y col), Williams & Wilkins, Baltimore, p. 297.
- Marriott, J.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1969) Biochem. J. 111, 385.
- Marver, H.S. & Schmid, R. (1972) en "The metabolic basis of Inherited Diseases" (Ed. J.B. Stanburg y col) Mc Graw-Hill Book Co., New York; 3rd. ed., p. 1087.

- Nakakuchi, M.; Yamauchi, K.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1738.
- Neuberger, A.; Sandy, J.D. & Tait, G.H. (1973 a) Biochem. J. 136, 477.
- Neuberger, A.; Sandy, J.D. & Tait, G.H. (1973 b) Biochem. J. 136, 491.
- Neuberger, A.; Sandy, J.D. & Tait, G.H. (1973 c) Enzyme 16, 79.
- Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 153, 34.
- Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 178, 607.
- Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1979) J. Biochem. 85, 239.
- Ohashi, A. & Shinohara, H. (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 370.
- Oyama, H. & Tuboi, S. (1979) J. Biochem. 86, 483.
- Rimington, C. (1966) en "Control of Haemoglobin and Porphyrin synthesis with special reference to porphyrias" Relazione al VI Congresso Internazionale di Patologia Clínica. Roma p. 341.
- Rossi-Fanelli, A.; Antonini, E. & Caputo, A. (1964) Adv. Protein Chem. 19, 73.
- Sandy, J.D.; Davies, R.C. & Neuberger, A. (1975) Biochem. J. 150, 245.
- Tenhunen, R.; Marver, H.S. & Schmid, J.R. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 61, 748.
- Tenhunen, R.; Marver, H.S. & Schmid, J.R. (1970) J. Lab. Clin. Med. 75, 410.
- Tuboi, S. & Hayasaka, S. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 146, 282.
- Tuboi, S. & Hayasaka, S. (1972 a) Arch. Biochem. Biophys. 150, 690.
- Tuboi, S. & Hayasaka, S. (1972 b) J. Biochem. 72, 219.
- Tuboi, S.; Kim, H.J. & Kikuchi, G. (1970 a) Arch. Biochem. Biophys. 138, 147.

- Tuboi, S.; Kim, H.J. & Kikuchi, G. (1970 b) Arch. Biochem. Biophys. 138, 155.
- Viale, A.A.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 729.
- Wider de Xifra, E.A.; Sandy, J.D; Davies, R.C. & Neuberger, A. (1976) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 273, 79.
- Yoda, B. & Israels, L.G. (1972) Can. J. Biochem. 50, 633.

ACIDO  $\delta$ -AMINOLEVULICO SINTETASA

---

	Página
IV.1. Introducción	72
IV.2. Distribución biológica	72
IV.3. Propiedades catalíticas	74
IV.3.1. Especificidad de sustrato	74
IV.3.2. Inhibidores y activadores	76
IV.3.3. Estabilidad	79
IV.4. Propiedades proteicas	81
IV.5. Mecanismo de reacción	84
IV.6. Inducción	92
IV.6.1. Porfiria química o experimental	92
IV.6.2. Compuestos químicos que inducen al ALA-S	92
IV.6.3. Factores que afectan la inducción del ALA-S	94
IV.6.4. Mecanismo de inducción	94
Referencias	96

## IV. ACIDO $\delta$ -AMINOLEVULICO SINTETASA

### IV.1. INTRODUCCION

En 1953, Shemin y Russell identificaron un nuevo compuesto capaz de reemplazar a la glicina y al "succinato activo" en un sistema formador de hemo *in vitro*, obtenido a partir de eritrocitos de aves: el ácido  $\delta$ -aminolevúlico (ALA), y propusieron que la condensación entre la glicina y el succinato activo producía el ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -cetoadípico, el cual por decarboxilación formaba ALA.

Posteriormente, Gibson y col (1958), también trabajando con eritrocitos de aves, y Kikuchi y col (1958 a y b) con *Rp. spheroides* demostraron la formación de ALA a partir de glicina y succinil-CoA por acción de la enzima ALA-Sintetasa (ALA-S). Desde entonces estudios con marcación isotópica han establecido que el ALA es la fuente de los átomos de carbono y nitrógeno del hemo (Shemin y Russell, 1953); y que además es el precursor del núcleo corrina de la vitamina B<sub>12</sub> (Shemin y Bray, 1964) así como del anillo porfirínico de la clorofila (Duranton y col, 1958; Granick, 1959; Castelfranco y Jones, 1975; Manetas y Akayunoglu, 1975) y de la estructura tetrapirrólica de las ficobilinas (Troxler y Lester, 1967). Se requieren 8 moléculas de ALA por cada unidad tetrapirrólica formada.

### IV.2. DISTRIBUCION BIOLOGICA

Como se mencionara, el ALA-S fue originalmente descrita en extractos de bacterias fotosintéticas (Kikuchi y col, 1958 a) y de eritrocitos de aves (Gibson y col, 1958).

A partir de entonces la enzima ha sido detectada y estudiada en diversas fuentes tales como *Spirillum itersonii* (Graffon, 1934); *Rp. spheroides* (Gibson, 1958; Kikuchi y col, 1958 a y b; Burnham, 1970; Porra y col, 1972 a); *R. rubrum* (Kikuchi y col, 1958 a y b); *Propionibacterium shermanii* (Menon y Shemin, 1967); *Saccharomyces cerevisiae* (Barreiro, 1967); *Chromatium D* (Burnham, 1970); extractos libres de células de *Torulopsis utilis* (Porra e Irving, 1970; Porra y col, 1972 b); *Micrococcus denitri*



*ficans* (Tait, 1973); *Rp. palustris* (Viale y col, 1980); eritrocitos de ave (Brown, 1958 a; Laver y col, 1958); mitocondrias de hígado de cobayo (Granick y Urata, 1963); homogenatos de hígado de rata (Marver y col, 1966; Tomio y Grinstein, 1968); mitocondrias de glándula de Harder de rata (Tomio y Grinstein, 1968); corazón de rata (Brigs y col, 1976); glándula suprarrenal de rata y bovina (Condie y col, 1976); reticulocitos de conejo (Aoki y col, 1971) y de humanos (Feldman y Lichtman, 1967); hígado, eritrocitos y fibroblastos humanos (Marver y col, 1972); plasma humano (Miyagi y Watson, 1972); médula ósea (Jordan y Shemin, 1972); mitocondrias de abeja obrera (Osanai y Rembold, 1974) y mitocondrias de mosca casera (Rhee y Plapp, 1975).

La primera detección de ALA-S en un sistema de origen vegetal proviene de nuestro laboratorio, y fue efectuada en extractos de callos de soya (Wider de Xifra y col, 1971). Posteriormente Ramaswamy y Nair (1973) reportaron actividad de ALA-S en la cáscara de papas estacionadas e iluminadas durante 3 semanas a 0-4 °C. En esas condiciones se producía enverdecimiento de la cáscara del tubérculo causado por la presencia de clorofila.

No se encontró actividad de ALA-S en proplástidos y cloroplastos, como tampoco en la fracción mitocondrial de plantas superiores (Porra e Irving, 1970).

Algunos investigadores publicaron resultados negativos en lo que respecta a sus intentos para detectar ALA-S en extractos de plantas (Gassman, 1967; Tait, 1968; Porra e Irving, 1970; Beale, 1971; Porra y Grimm, 1973, 1974).

Gassman (1967) comprobó que extractos de *Chlorella* y hojas de angiospermas contenían sustancias que inhibían al ALA-S de *Rp. spheroides*. El autor sugirió la presencia de inhibidores que podrían impedir la detección del ALA-S presente en extractos de plantas.

Beale (resultados no publicados y reportados por Beale, 1971) también detectó la presencia de ciertos inhibidores del ALA-S en *Chlorella*, pero postuló que el grado de inhibición no era suficiente para explicar la falta total de la actividad del ALA-S en dichos extractos.

Recientemente el mismo investigador (Beale y col, 1981), reportó la existencia de ALA-S en el alga verde unicelular *Eugle*

*na gracilis*; halló altos niveles de actividad en células de la cepa salvaje crecidas en oscuridad y en una mutante  $W_{14} Z Na I L$  cuyas células crecen blancas y aplástidas ya sea bajo luz o en oscuridad. Propuso que el rol del ALA-S en *E. gracilis* sería proveer precursores para la síntesis de los tetrapirroles requeridos en la mitocondria.

En la mayoría de los tejidos estudiados, el ALA-S se encuentra asociada a la fracción particulada. Sin embargo, en ratas tratadas con alil-isopropilacetamida (AIA), un potente inductor químico de la síntesis de porfirinas en hígado, se detectó un aumento considerable de la actividad del ALA-S citoplasmática (Hayashi y col, 1969; Whiting y Elliot, 1972; Patton y Beattie, 1973).

Actualmente, existen numerosas evidencias que sugieren que tanto la enzima mitocondrial como la citosólica son sintetizadas sobre los polirribosomas citoplasmáticos y que el ALA-S citosólica representa una forma de la enzima en tránsito hacia la mitocondria (Hayashi y col, 1969; Granick y Sassa, 1971; Whiting y Elliot, 1972).

En levaduras, la actividad está presente tanto en la mitocondria como en el citoplasma (Labbe-Bois y Volland, 1977).

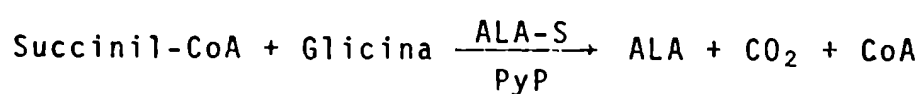
En bacterias, el ALA-S tiene mayor actividad específica cuando ellas crecen en condiciones que poseen alto contenido de bacterioclorofila y/o hemoproteínas (Gibson y col, 1958; Burnham y Lascelles, 1963; Menon y Shemin, 1967; Marriott, 1968).

### IV.3. PROPIEDADES CATALITICAS

#### IV.3.1. Especificidad de sustrato

Las experiencias de Shemin (1957) utilizando marcadores isotópicos llevaron a reconocer que el ALA era el primer producto de la cadena biosintética del hemo.

Como ya se mencionó, el ALA se forma a partir de glicina y succinil-CoA de acuerdo a la Reacción 1



Reacción 1

El requerimiento del fosfato de piridoxal (PyP) para la síntesis del hemo fue originalmente demostrada mediante experimentos nutricionales. En 1950 Wintrobe encontró que cerdos deficientes en vitamina B<sub>6</sub> formaban glóbulos rojos pequeños con muy bajo contenido de protoporfirina libre, acumulaban hierro y sus médulas óseas eran hiperplásicas. Lascelles (1964) comprobó que para la síntesis de porfirinas en *Tetrahymena vorax* se requería tanto la vitamina B<sub>6</sub> como el ácido pantoténico. Similarmente Schulman y Richert (1957) demostraron que en patos hemo-deficientes se necesitaba vitamina B<sub>6</sub> y CoA para normalizar la síntesis de hemo.

La Reacción 1 justifica los resultados mencionados pues indica que un bajo contenido de hemo puede deberse a la falta de ambas vitaminas, fosfato de piridoxal y CoA, las cuales se requieren para el paso limitante de la biosíntesis de porfirinas.

El tamaño pequeño de los eritrocitos en el caso de deficiencia de fosfato de piridoxal se debe probablemente no sólo a la necesidad de esta coenzima para las síntesis de aminoácidos y hemo, sino también al hecho de que, una síntesis baja de hemo es acompañada por una menor síntesis de globina (Granick y Sassa, 1971). Estudios recientes en *E. gracilis* (Dzelzkalns y col, 1982) demostraron un absoluto requerimiento de ALA-S por el PyP ya que en ausencia del mismo la enzima pierde actividad rápida e irreversiblemente.

En mamíferos la síntesis de succinil-CoA en los glóbulos rojos y hepatocitos puede producirse a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato o succinato. La formación de succinil-CoA ocurre en la mitocondria como parte de las reacciones del ciclo del ácido cítrico.

En experiencias efectuadas por Shemin (1957) empleando acetato y succinato radioactivos, y los estudios de inhibición realizados por Granick y Mauzerall (1958) con malonato, trans-acetonitro, fluoracetato y arsenito, permitieron comprobar el requerimiento del ciclo del ácido cítrico para la síntesis de ALA, protoporfirina y hemo; además el requerimiento por la fosforilación oxidativa se evidencia por la inhibición de la síntesis de ALA con dinitrofenol, compuesto que también inhibe al ALA-S (Granick y Mauzerall, 1958; Falk, 1964).

Gibson y col (1961) fueron los primeros en demostrar que el succinil-CoA era uno de los sustratos del ALA-S; sus estudios

con mitocondrias de hígado indicaron que el ALA-S es específica por el succinil-CoA. La formación de aminocetonas a partir de acetil-CoA y glicina es catalizada por otra enzima (Urata y Granick, 1963; Granick y Urata, 1963).

El Km para la glicina varía entre 2 y 10 mM para la enzima aislada de fuentes animales y de 0,1 a 30 mM para el ALA-S de *Rp. spheroides*. Los valores de Km para succinil-CoA oscilan entre 5 y 70  $\mu$ M y entre 2 y 10  $\mu$ M para el fosfato de piridoxal (Jordan y Shemin, 1972; Whiting y Granick, 1976). Los altos valores de Km reportados para la glicina sugieren que éste serfa el sustrato limitante (Granick y Sassa, 1971).

#### IV.3.2. Inhibidores y activadores

Los reactivos de grupos -SH tales como p-cloromercuribenzoato (PCMB), cloruro mercúrico y N-etilmaleimida (NEMI) inhiben a la enzima purificada de *Rp. spheroides*, al igual que algunos iones metálicos como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  (Yubisui y Yoneyama, 1972). Estas inhibiciones son revertidas parcialmente por incubación de la enzima inhibida con 2-mercaptoetanol. Dichos resultados sugieren la existencia de grupos sulfhidrilos en el ALA-S, esenciales para su actividad. Previamente, Lascelles (1956) había encontrado que distintas sales de hierro inhibían la formación de porfirinas en esta misma bacteria a partir de glicina y  $\alpha$ -cetoglutarato.

Es de suma importancia el hecho de que algunos metabolitos de la rama hierro de la biosíntesis de tetrapirroles, tales como protohemo y hemina, inhiben al ALA-S (Gibson y col, 1961; Burnham y Lascelles, 1963), aunque esta inhibición se revierte fácilmente (Burnham, 1962).

La inhibición de la hemina sobre la enzima de hígado de rata es no-competitiva respecto al succinil-CoA y mixta respecto a la glicina (Kaplan, 1971).

La hemina inhibe al ALA-S formando un complejo de coordinación a través de su átomo de hierro (Porra y col, 1972 a). Este mecanismo fue comprobado observando la disminución de la inhibición producida por hemina cuando este compuesto se convertía en el quelato bis-imidazólico. Además, la capacidad de ciertos ligandos de disminuir la inhibición por hemina estaba correlacionada con sus afinidades respectivas por dicho compuesto. Aumen-

tando la concentración de imidazol se revertía el efecto inhibitorio.

En eritrocitos, el  $\alpha$ -cetoglutarato es un inhibidor competitivo de la glicina inhibiendo la síntesis de ALA a concentraciones del orden de 1 mM (Granick y Sassa, 1971).

Se ha comprobado también que los nucleótidos y nucleósidos tienen acción sobre la biosíntesis de porfirinas en *Rp. spheroides*, hígado de rata y callos de semillas de soya (Gajdos y Gajdos-Török, 1963 a y b). En *Rp. spheroides* la biosíntesis de porfirinas es inhibida por ATP, y en menor grado por ADP y AMP; se sugirió que el ATP aumentaría la formación de un supuesto inhibidor fisiológico de la síntesis de porfirinas (Gajdos y Gajdos-Török, 1965). El ATP  $10^{-3}$  M inhibe un 75% el ALA-S purificada de esta fuente bacteriana (Fanica-Gaignier y Clément-Metral, 1971). Incluso la glucosa exógena tiene un efecto inhibitorio sobre la biosíntesis de porfirinas en *Rp. spheroides*, que podría deberse a la formación de ATP durante la glicólisis anaeróbica (Gajdos y Gajdos-Török, 1973 a). Por otro lado, se comprobó que la glucosa exógena o el ATP estimulan la formación de porfirinas cuando los microorganismos se hacen crecer en un medio que contiene ALA como sustrato. Gajdos y Gajdos-Török (1973, b) postularon que el efecto inhibitorio de la glucosa y el ATP precede la formación de ALA en el camino biosintético de las porfirinas.

Mediante el estudio de los niveles de ALA-S en células de *Rp. spheroides* crecidas fotosintéticamente o bien en oscuridad y aerobiosis, y sometidas tanto a oxigenación como exposición a cloranfenicol o puromicina, se obtuvieron evidencias de que en el primer tipo de células existían dos formas de ALA-S con diferentes estabilidades, mientras que en el segundo existía una única forma de ALA-S relativamente estable (Higuchi y col, 1968). Se postuló que el ALA-S de las células crecidas a la luz o en las que la enzima fue inducida era metabólicamente inestable, y la estabilidad *in vivo* sería muy afectada por el estado redox intracelular. El ALA-S de las células crecidas aeróbicamente sería constitutiva y metabólicamente estable.

Fanica Gaignier y Clément-Metral (1973 a) han aislado y purificado dos especies de ALA-S que difieren en su contenido de grupos sulfhidrilos. Ambas especies enzimáticas aparecen compartimentalizadas en *Rp. spheroides* V (Fanica Gaignier y Clément-Me

tral, 1973 b). Una de estas especies parece estar relacionada con el metabolismo respiratorio en oscuridad y es una enzima citoplasmática, mientras que la otra, inducida sólo a la luz, se encuentra en cromatóforos y su actividad se correlaciona con el fotometabolismo.

Marriott y col (1969) comprobaron que el ALA-S de *Rp. spheroides* crecida semianaeróbicamente, se activaba espontáneamente durante la primer hora por almacenamiento a 4 °C de los extractos sonicados de las células. La actividad del ALA-S proveniente de células oxigenadas antes de la sonicación no sufría activación espontánea. Los mismos autores detectaron en células semianaeróbicas una fracción de bajo peso molecular, termoestable capaz de reactivar el ALA-S de células oxigenadas, como así también otra fracción termoestable y de bajo peso molecular, en células oxigenadas, que inhibía la activación espontánea de la enzima. El efecto del oxígeno podría estar mediado por alteraciones en las concentraciones del activador y del inhibidor del ALA-S. El proceso de activación espontánea del ALA-S en *Rp. spheroides* no ocurría en presencia de cianuro o azida (Marriott y col, 1970). Para que se produjera la activación, debía oxidarse algún compuesto quizás vía la cadena de transporte de electrones.

Tuboi y col (1969) reportaron la existencia de un inhibidor específico y reversible del ALA-S en extractos de *Rp. spheroides*. Dicho compuesto era lábil y sensible a la luz. No era hemina, ni protoporfirina, ni bacterioclorofila, ni ningún compuesto relacionado. Se sugirió que este inhibidor intervendría en la biosíntesis de tetrapirroles controlando la actividad del ALA-S.

Como se mencionó en el Capítulo III, estudios posteriores efectuados por Wider de Xifra y col (1976) demostraron que la actividad de ALA-S en *Rp. spheroides* estaría controlada por la concentración de trisulfocistina; en cuya síntesis y degradación intervienen dos enzimas del metabolismo de sulfocompuestos, cistationasa y rodenasa, respectivamente.

Recientemente, Simpson y Beattie (1980) purificaron a partir de mitocondrias de hígado de rata una proteína capaz de activar al ALA-S. El peso molecular del activador era de  $57.000 \pm 6.000$  determinado por cromatografía de exclusión en gel y de  $54.000 \pm 6.000$  determinado por electroforesis en gel con dodecilsulfato de sodio. Los mismos autores comprobaron que la proteína activadora favorecía la formación de dímeros compuestos

por dos moléculas de ALA-S y también puede combinarse con la enzima formando complejos tetramero-activador o agregados de mayor peso molecular; en base a estos resultados postularon que el activador regularía la actividad de ALA-S mitocondrial de hígado de rata modificando la estructura cuaternaria de la misma. Previamente, Irving y Elliot (1969) habían reportado la existencia de un inhibidor en mitocondria de hígado de cobayo.

Es posible que exista un inhibidor y un activador del ALA-S y que la acción de ambos permita ejercer un control más fino de la actividad de esta enzima.

#### IV.3.3. Estabilidad

El ALA-S es generalmente inestable (Kikuchi y col, 1958 b; Burnham y Lascelles, 1963; Wider de Xifra y col, 1971); esta característica dificulta su detección aún en tejidos donde se tiene una absoluta certeza de su existencia. Por ejemplo, se encontró ALA-S activa en *Rhodospirillaceae* (Kikuchi y col, 1958 a y b; Lascelles, 1960), pero es difícil detectarla en *Chromatiaceae*, organismos que sintetizan tanta bacterioclorofila como los otros. El nivel de ALA-S en hígado de cobayo normal es apenas detectable, pero si se induce porfiria experimental, se obtiene una actividad adecuada para su medición (Granick y Urata, 1963). Empleando compuestos radioactivos se han desarrollado técnicas que han permitido medir esta enzima en tejidos normales (Tschudy y col, 1965; Perlroth y col, 1966; Irving y Elliot, 1969). Pero aún así, resulta difícil trabajar con esta enzima. Algunos hechos experimentales nos permiten especular sobre las causas de su inestabilidad:

- La enzima es muy inestable tanto en extractos crudos como parcialmente purificada.
- Es inhibida por varias sustancias presentes en la célula, como así también por reactivos de uso común utilizados en el trabajo con proteínas.
- Algunos sistemas tienen una deacilasa muy activa (Granick y Urata, 1963) que compite con el ALA-S por la succinil-CoA, privando a la enzima de uno de sus sustratos.
- Los requerimientos de cofactores parecen variar de un organismo a otro; es indudable el requerimiento de PyP o de CoA y ATP en sistemas que generan succinil-CoA "in situ", pero aparentemente hay diferencias en las fuerzas de unión de esos cofactores.

res; y en algunos casos es necesario añadir cofactores exógenos, por ejemplo la síntesis de ALA se encuentra disminuída en eritrocitos de ave hierro-deficientes, el agregado del metal aumenta notablemente dicha síntesis, mientras que este mismo metal es un inhibidor del ALA-S en *Rhodospirillaceae* (Brown, 1958 b; Vogel y col, 1960).

La inestabilidad de esta enzima puede considerarse desde dos puntos de vista, inestabilidad termodinámica debido a una peculiar estructura proteica e inestabilidad metabólica.

Su desnaturalización espontánea en función del tiempo, aún almacenada a  $-15^{\circ}\text{C}$ , sugiere una inestabilidad termodinámica; esta sería una propiedad inherente al ALA-S determinada por su estructura.

Para analizar la inestabilidad metabólica de la enzima debe considerarse la alta velocidad de recambio del ALA-S. La vida media de esta enzima varía según la fuente enzimática. En cultivos de tejido de hígado de embrión de pollo es de 4 a 6 horas (Granick, 1966).

Hayashi y col (1969) midieron la actividad de ALA-S *in vivo* usando inhibidores de síntesis proteica hallando para la enzima soluble de hígado de rata una vida media de 20 minutos, mientras que el valor estimado para el ALA-S mitocondrial fue de 60 minutos. Woods (1974) empleando una metodología análoga reportó un valor de 34 minutos para la enzima proveniente de hígado fetal de rata.

El ALA-S es la enzima con menor vida media de las reportadas en hígado mamífero, incluso dentro de las inducibles. La corta vida media de esta enzima aparentemente depende de otros constituyentes celulares.

Cuando se aisló la mitocondria hepática de cobayo tratado con 3,5-dicarbetoxy-4-dihidrocolidina (DDC), la actividad del ALA-S se mantuvo constante durante un período de por lo menos 5 horas (Granick y Urata, 1963). Estos hallazgos sugieren que puede haber un proceso activo de destrucción del ALA-S que ocurre en la célula pero no necesariamente en la mitocondria aislada. Sin embargo, posteriormente, Aoki (19 ) describió en mitocondria de médula ósea la presencia de una proteasa específica para el ALA-S. La proteasa purificada exhibía una alta actividad



proteolítica hacia aquella enzima. La existencia de una proteasa específica mitocondrial para el ALA-S, explicaría la vida media corta de esta enzima.

El etanol (Burnham, 1968) y el glicerol (Warnick y Burnham, 1971) son estabilizantes de la enzima de algunas fuentes, aunque el 2-mercaptoetanol sea quizás el más efectivo de sus estabilizantes, si bien su efecto se vuelve inhibitorio cuando la enzima está muy purificada (Aoki y col, 1971; Yubisui y Yoneyama, 1972). Yubisui y col (1976) demostraron que el glicerol y el etilenglicol no sólo protegen a la enzima de la inactivación, sino que también son capaces de reactivarla. Estos autores midieron los valores de  $K_m$  para fosfato de piridoxal y glicina utilizando ALA-S recientemente preparada de *Rp. spheroides*, parcialmente inactivada y reactivada por acción del glicerol o etilenglicol.

Las tres preparaciones exhibían el mismo valor de  $K_m$  respecto de la glicina, mientras que para el PyP los valores con enzima inactivada eran mayores que con la enzima fresca. Por reactivación el valor disminuyó a los niveles correspondientes a la enzima fresca. Estos resultados sugieren que la labilidad de la conformación proteica alrededor del sitio de unión del fosfato de piridoxal podría ser responsable, al menos en parte, de la inactivación que sufre la enzima.

#### IV.4. PROPIEDADES PROTEICAS

El peso molecular del ALA-S varía, dependiendo del tejido en estudio, de la especie de la que proviene y de las condiciones de purificación.

Uno de los parámetros que afecta la determinación del peso molecular es la fuerza iónica del buffer utilizado durante el proceso de purificación. En un buffer con baja fuerza iónica se producen agregados de mayor peso molecular, principalmente cuando se trabaja con la enzima citosólica (Whiting y Elliot, 1972). La enzima purificada requiere la presencia de un protector de grupos sulfhidrilos para su estabilidad. Teniendo en cuenta estas consideraciones, Whiting y Elliot (1972) encontraron un valor de 77.000 y 148.000 daltons para el ALA-S de hígado de rata mitocondrial y citoplasmática respectivamente. Determi-

nando además, que anticuerpos preparados contra la enzima mitocondrial purificada, daban reacción cruzada con la enzima citosólica (Whiting y Granick, 1976).

El ALA-S de *Rp. spheroides* ha sido purificada y el grado de pureza determinado por su comportamiento electroforético en presencia o ausencia de dodecilsulfato de sodio y ultracentrifugación analítica (Nandi y Shemin, 1977). El peso molecular hallado por varios métodos resultó ser 80.300. El valor obtenido para la enzima denaturalizada con dodecilsulfato de sodio o clorhidrato de guanidina fue de 45.000 y 41.000 daltons respectivamente sugiriendo estos datos la naturaleza dimérica de la proteína que fue luego confirmada mediante estudios de sedimentación en gradientes de sacarosa y por electroforesis en gel en presencia de dodecilsulfato de sodio. Una estructura cuaternaria similar se reportó para el ALA-S mitocondrial de hígado de embrión de pollo (Whiting y Granick, 1976) ya que la enzima purificada a partir de este tejido presentó un peso molecular de 87.000, estando formada por dos subunidades iguales.

Ohashi y Kikuchi (1977) purificaron ALA-S de la fracción citosólica de hígado de ratas tratadas con AIA. La enzima mostraba un peso molecular de 320.000 y se disociaba en tres componentes proteicos por centrifugación en gradiente de sacarosa en presencia de NaCl 0,25 M. Una de las tres bandas tenía un peso molecular de 110.000 y era catalíticamente activa. Las otras dos eran catalíticamente inactivas. Por recombinación de los tres componentes proteicos se obtenía el ALA-S citosólica original. La enzima también perdía sus proteínas unidas cuando se trataba con distintas proteasas y por digestión con tripsina se obtenía una enzima de peso molecular 170.000 que representaría, tal vez, el complejo mitocondrial. La enzima citosólica tendía a agregarse en dímeros de peso molecular 650.000 - 700.000. La hemina estimulaba la formación de dichos dímeros, los cuales eran difícilmente dissociables en sus componentes proteicos. Posteriormente estos mismo autores (Ohashi y Kikuchi, 1979), purificaron el ALA-S citosólica de hígado de rata en dos formas: una compleja y otra simple, esta última representaría el componente proteico catalíticamente activo del complejo. Por electroforesis en gel de policacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio, obtuvieron tres bandas asignándoles pesos moleculares de 120.000, 79.000 y 51.000 daltons a cada una. Se de-

mostró que el peso molecular del componente catalíticamente activo del ALA-S citoplasmática tenía el mismo peso molecular que la enzima mitocondrial y que en la fracción particulada la proteína existiría como un dímero, con subunidades idénticas de peso molecular 51.000. Estos datos sugieren que la enzima citosólica podría ser un complejo, compuesto por una subunidad catalíticamente activa de peso molecular 51.000 y dos subunidades inactivas de pesos moleculares 79.000 y 120.000. Usando un anticuerpo específico desarrollado para el ALA-S purificada, Nakaku ki y col (1980) demostraron que ambas enzimas eran inmunológicamente idénticas. Las proteínas inactivas parecerían modular las propiedades catalíticas del componente activo del ALA-S citosólica (Ohashi y Kikuchi, 1979).

Paterniti y Beattie (1979) purificaron la enzima de mitocondria de hígado de ratas jóvenes no-inducida. La preparación enzimática sometida a una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio, migraba como una única banda de peso molecular  $58.000 \pm 6.000$ . La enzima nativa probablemente sea un dímero de peso molecular 120.000.

Recientemente, Yamamoto y col (1982) aislaron polisomas de hígados de ratas tratadas con AIA y llevaron a cabo una síntesis activa de ALA-S *in vitro*, obteniéndose un peso molecular mínimo de alrededor de 75.000, mientras que el valor obtenido para la enzima mitocondrial fue de 66.000. Los autores proponen que la enzima citosólica sería completamente susceptible al ataque de proteasas endógenas.

La enzima purificada de *Euglena gracilis* fue cromatografiada sobre gel de agarosa obteniéndose una única banda de actividad correspondiente a un peso molecular de 138.000 (Dzelzkalns y col, 1982), independientemente del tipo de célula o de las condiciones de crecimiento empleadas. Este valor de peso molecular se encuentra dentro de los valores reportados para el ALA-S de fuentes animales cuyos valores oscilan entre 100.000 y 300.000 para el dímero nativo, pero difiere del valor reportado para *Rp. spheroides* (entre 60.000 y 80.000). Esta diferencia sugiere que existiría una divergencia evolucionaria mayor entre las enzimas de procariotes y eucariotes que entre las formas animales y euglenoide.

#### IV.5. MECANISMO DE REACCION

Neuberger en 1961 propuso para la síntesis enzimática de ALA un mecanismo según el cual se formaría primero un carbanión estable a partir de glicina y fosfato de piridoxal; éste reaccionaría con el átomo de carbono electrofílico del carbonilo de la succinil-CoA produciendo ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -cetoadípico y luego por pérdida de  $\text{CO}_2$  se formaría ALA. Matthew y Neuberger (1963) reportaron que el aminomalonato ( $\alpha$ -carboxiglicina) era un inhibidor competitivo de la reacción; este resultado experimental avalaba el mecanismo propuesto, además se sabía que el ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -cetoadípico se decarboxilaba espontáneamente en solución neutra (Laver y col, 1959). Por lo tanto quedaba por dilucidar si éste se formaba y decarboxilaba unido a la enzima o bien si lo hacía libre en solución y por otro lado, si realmente era un intermediario ya que era posible que la condensación y decarboxilación ocurrieran en forma concertada (Figura IV.1.).

El hecho de que preparaciones de eritrocitos y extractos bacterianos con actividad de ALA-S también catalizaban la formación de aminocetonas a partir de glicina y acetil-CoA por una reacción análoga a la formación de ALA, sugería que la enzima no era específica para succinil-CoA. Sin embargo, en mitocondrias de hígado se determinó que estas reacciones eran catalizadas por enzimas diferentes (Urata y Granick, 1963).

Teniendo en cuenta los conocimientos sobre las reacciones de transformación de aminoácidos en las cuales participa el fosfato de piridoxal se pueden postular dos tipos de mecanismos para la biosíntesis de ALA a partir de glicina y succinil-CoA (Figuras IV.1. y IV.2.). En ambos, el primer paso implicaría la formación de una base de Schiff entre la enzima unida al fosfato de piridoxal y a la glicina (2). Esta unión altera las propiedades de los grupos C-H y -COOH de la glicina, transformando las uniones que son muy estables en el aminoácido primitivo, en lábiles, como consecuencia de la atracción de electrones por el núcleo piridínico. Se supone que en reacciones que necesitan al fosfato de piridoxal como cofactor, la propiedad de atracción de electrones puede verse exaltada por la presencia, en el sitio activo de la enzima, de un grupo capaz de protonar al nitrógeno de la piridina, como se muestra en el compuesto (2) (Figuras IV.1 y 2). Se ha postulado en el mecanismo 1 que una reacción de de

carboxilación formaría el carbanión (4), y éste se condensaría con succinil-CoA dando un complejo de base de Schiff de ALA enca<sup>u</sup>denado a la enzima unida al fosfato de piridoxal (5). Dicho com<sup>u</sup>plejo por hidrólisis produciría ALA libre (Figura IV.1.).

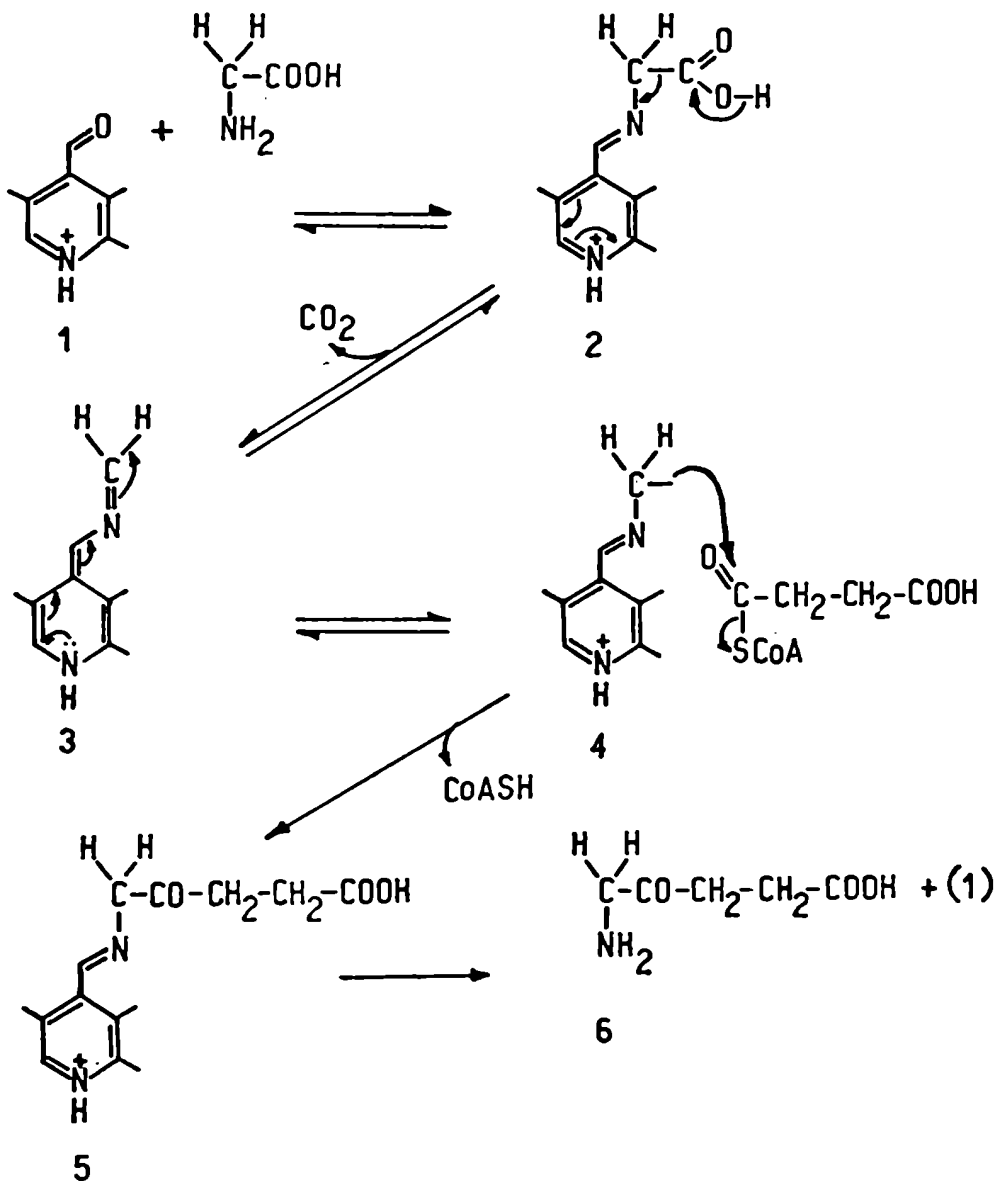


FIGURA IV.1.: Mecanismo 1 para la reacción del ALA-S. La estructura 1 representa la enzima unida a fosfato de piridoxal (Akhtar y col, 1976).

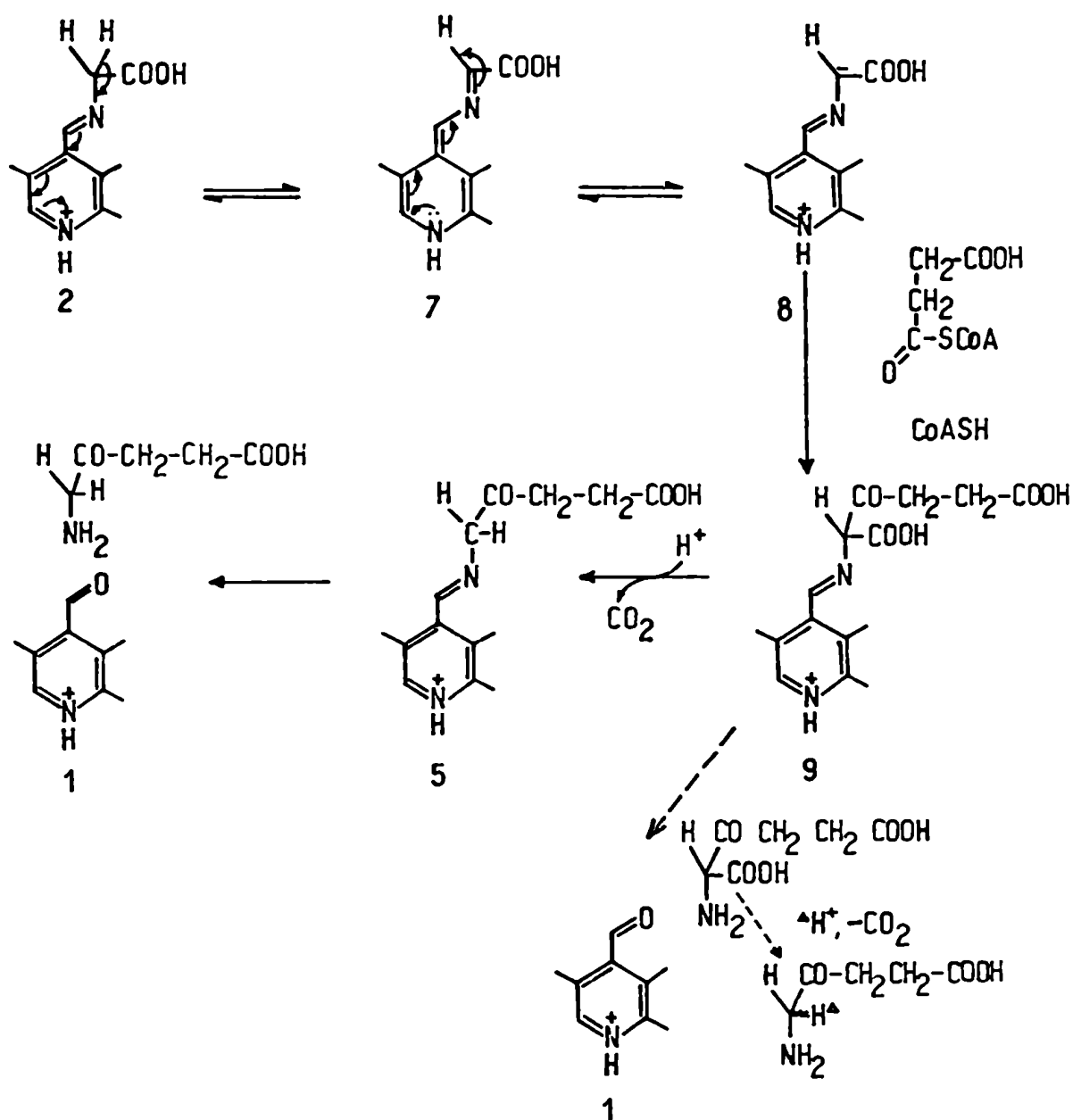


FIGURA IV.2.: Mecanismo 2 a ( $\rightarrow$ ) y 2 b ( $-\rightarrow$ ) para la reacción del ALA-S (Akhtar y col, 1976).

En el mecanismo 2 el primer paso sería la eliminación de un protón para dar otro tipo de carbanión (7 $\rightarrow$ 8), el que reaccionaría con succinil-CoA quedando los seis átomos de los sustra-

tos encadenados al complejo enzima-fosfato de piridoxal como ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -cetoadípico (9). Existirían en este punto dos alternativas para la formación de ALA; en una de ellas (mecanismo 2 a) ocurriría una decarboxilación por la presencia de un grupo  $\beta$ -carbonilo, resultando un complejo enzima-fosfato de piridoxal (5), el que por hidrólisis produciría el ALA libre. La otra alternativa involucra la hidrólisis del intermediario (9) liberando ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -cetoadípico, que se decarboxilaría no enzimáticamente produciendo ALA.

Para determinar el verdadero mecanismo de la reacción del ALA-S se prepararon glicinas quirales, conteniendo tritio estereoespecíficamente localizado en orientación R o S (Jordan y Akhtar, 1970; Akhtar y col, 1976), utilizando la enzima serina-transhidroximetilasa que cataliza la interconversión de glicina y serina, dependiente de ácido tetrahidrofólico y tiene la particularidad de intercambiar estereoespecíficamente un átomo de hidrógeno pro-S del carbono  $\alpha$  de la glicina con protones del medio (Akhtar y Jordan, 1968, 1969; Jordan y Akhtar, 1970; Akhtar y col, 1975). Incubando la enzima en presencia de glicina (2RS- $H_2^3$  2- $C^{14}$ ), fosfato de piridoxal y ácido DL-tetrahidrofólico, se obtuvo una glicina que había perdido la mitad de la marca de tritio quedando el resto en la posición pro-R (Akhtar y Jordan, 1969; Jordan y Akhtar, 1970). El otro enantiómero, el que tiene la marca de tritio en la posición pro-S, se preparó incubando glicina en presencia de  $T_2O$  con serina-transhidroximetilasa y cofactores.

Las glicinas quirales así preparadas se usaron como sustrato del ALA-S purificada de *Rp. spheroides*. El ALA formado se redujo con  $NaBH_4$  y el dihidroxiderivado se oxidó con periodato, transformándose el  $C_5$  en formaldehído (Zaman y col, 1973). Durante este procedimiento se mantuvo la integridad de los átomos de hidrógeno del  $C_5$  del ALA, y además, dicho compuesto formado enzimáticamente no podía intercambiar hidrógenos del  $C_5$  por protones del medio al pH óptimo de la enzima.

Con esta metodología pudo demostrarse que cuando se incubaba glicina (2RS- $H_2^3$ ) con ALA-S en presencia de succinil-CoA y los cofactores necesarios, se encuentra en el ALA formado la mitad de la radioactividad proveniente del tritio. Por otra parte, el ALA proveniente de la incubación con glicina (2R- $H^3$ ) no posee

radioactividad correspondiente a tritio, pero el que proviene de glicina ( $2S-H^3$ ) mantiene el total de la marca original (Zaman y col, 1973), con ésto quedó demostrado que la formación de ALA se produce con la pérdida de un sólo hidrógeno en la posición pro-R. Estos resultados permiten descartar el mecanismo 1 (Figura IV.1.) debiendo transcurrir la reacción según el mecanismo 2 a ó 2 b (Figura IV.2.).

Para decidir cual de estos dos mecanismos es el real, debe considerarse que en el mecanismo 2 a las reacciones de eliminación y de formación de nuevas uniones llevan a la creación de un  $C_5$  estéreo-específico del ALA, ya que ocurren mientras todos los intermediarios están unidos a la enzima, mientras que en el mecanismo 2 b la unión del hidrógeno al  $C_5$  del ALA no debe ser estéreo-específica, pues ocurre mediante una decarboxilación no-enzimática. El estudio experimental se ve complicado pues no se conocen métodos de oxidación del ALA que mantengan la quiralidad en  $C_5$ . Por ello se ideó un procedimiento indirecto, usándose ALA-S y ALA-D purificadas de *Rp. spheroides*; estas enzimas incubadas con glicina ( $2RS-H_2^3$ ) y los cofactores necesarios producen PBG marcado, compuesto que fue aislado y degradado con producción de glicina tritiada, la cual presentó quiralidad S (Abboud y col, 1974).

La formación de un centro quiral en el  $C_5$  del ALA biosintetizado a partir de glicina ( $2RS-H_2^3$ ) permite descartar la participación del mecanismo 2 b (Figura IV.2.).

En la Figura IV.3. se postula un mecanismo para el ALA-S basado en las evidencias encontradas; la primera reacción consiste en la eliminación del hidrógeno pro-R del complejo enzima-fosfato de piridoxal-glicina (13), dando el carbanión (14); éste se condensaría con succinil-CoA para dar (15). Se han hallado evidencias adicionales en favor de la formación de dicho carbanión, ya que incubando ALA-S altamente purificada con glicina ( $2RS-H_2^3$ ) en ausencia de succinil-CoA se obtiene un intercambio estereoespecífico del hidrógeno pro-R, resultando glicina ( $2S-H^3$ ). El átomo de hidrógeno intercambiado es el mismo que el eliminado en la biosíntesis completa del ALA (Laghai y Jordan, 1976). El átomo de hidrógeno pro-S de la glicina es retenido y ocupa la posición pro-S en el  $C_5$  del ALA.

Si se elimina el átomo de hidrógeno pro-R de la glicina



(2RS-H<sub>2</sub><sup>3</sup>) y se llega a ALA-C<sub>5</sub>(S-H<sup>3</sup>), debe invertirse la configuración de algún intermediario. Podría postularse que esta inversión ocurre en los primeros pasos, pero dada la preponderancia de mecanismos con retención de configuración que ocurren en las reacciones biológicas de reemplazo de uniones C-H por C-C, puede pensarse que dicha primera etapa ocurriría con retención de la configuración (Akhtar y col, 1976).

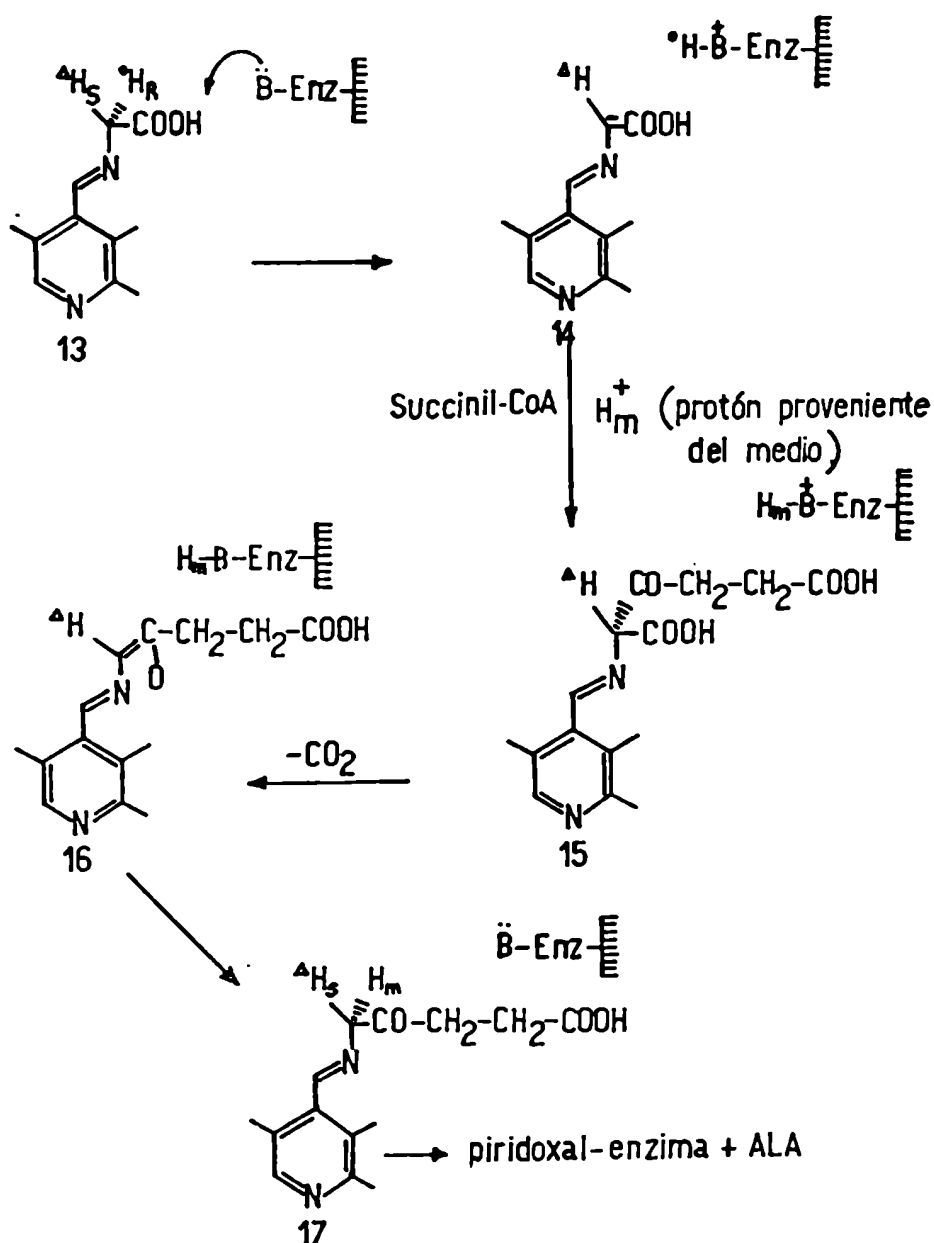


FIGURA IV.3.: Mecanismo y estereoquímica postulados para la reacción del ALA-S. Se supone que en la conversión 14  $\rightarrow$  15 el hidrógeno separado por el grupo básico de la enzima se intercambia con un protón del medio (Akhtar y col, 1976).

Por otra parte, Nandi (1978 a) comprobó que la apoforma pura del ALA-S de *Rp. spheroides* unía un mol de fosfato de piridoxal por mol de enzima y su espectro de absorción presentaba un máximo a 430 nm, con un hombro probable cerca de 320-330 nm típico para la formación de una base de Schiff por interacción de la proteína con el fosfato de piridoxal. Después de la reducción con borohidruro se observó un máximo de absorción a 325 nm característico de la formación de  $\epsilon$ -amino-fosfopiridoxil-lisina; este compuesto fue netamente identificado en hidrolizados ácidos del complejo  $\delta$ -aminolevulinato sintetasa-5-fosfato de piridoxal reducido. Los resultados aportaron fuertes evidencias a favor de la hipótesis de que un grupo crítico  $\epsilon$ -aminolisil estaría involucrado en la formación de la base de Schiff en la reacción entre la enzima y su cofactor. A continuación ocurriría una reacción de transaminación entre el complejo enzima-fosfato de piridoxal y la glicina, mecanismo sugerido por estudios espectrales (Nandi, 1978 b). Dichos ensayos demostraron que el complejo no reaccionaba con la succinil-CoA, pero formaba dos complejos con la glicina con absorciones máximas a 425 nm y 510 a 520 nm.

El aminomalonato, un inhibidor competitivo de la glicina, protegía a la apoenzima de la inactivación por  $\text{NaBH}_4$  en presencia de fosfato de piridoxal, apoyando este resultado la transaminación sugerida. Reacciones de intercambio isotópico muestran que el carbanión enzima-fosfato de piridoxal-glicina que ataca a la succinil-CoA no se forma por pérdida de  $\text{CO}_2$ . La formación de un pico a 510-520 nm por reacción entre el complejo enzima-fosfato de piridoxal y glicina, al que se le asigna una estructura quinoide, sugiere que la formación del carbanión es por pérdida de un átomo de hidrógeno  $\alpha$  de la glicina (Nandi, 1978 b). La decarboxilación es un proceso enzimático, esto puede deducirse considerando la reversibilidad de la reacción demostrada por la incorporación de  $^{14}\text{C}$  en la glicina a partir de  $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ . La decarboxilación enzimática del grupo glicilcarboxilo después de la reacción de condensación de la unidad succinil forma el ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -cetoadípico, un intermediario lógico en la formación de ALA (Nandi, 1978 b).

Los estudios de velocidades iniciales sugieren un mecanismo secuencial para la reacción.

En base a estos datos se propuso un mecanismo químico probable (Figura IV.4.). El paso de decarboxilación ocurre con retención de la configuración, mientras que el ataque inicial sobre la succinil-CoA ocurre sobre el lado opuesto y por lo tanto se libera el protón  $H_R$  de la glicina. Esto se debe posiblemente a la naturaleza electrofílica del carbón carbonilo de la succinil-CoA.

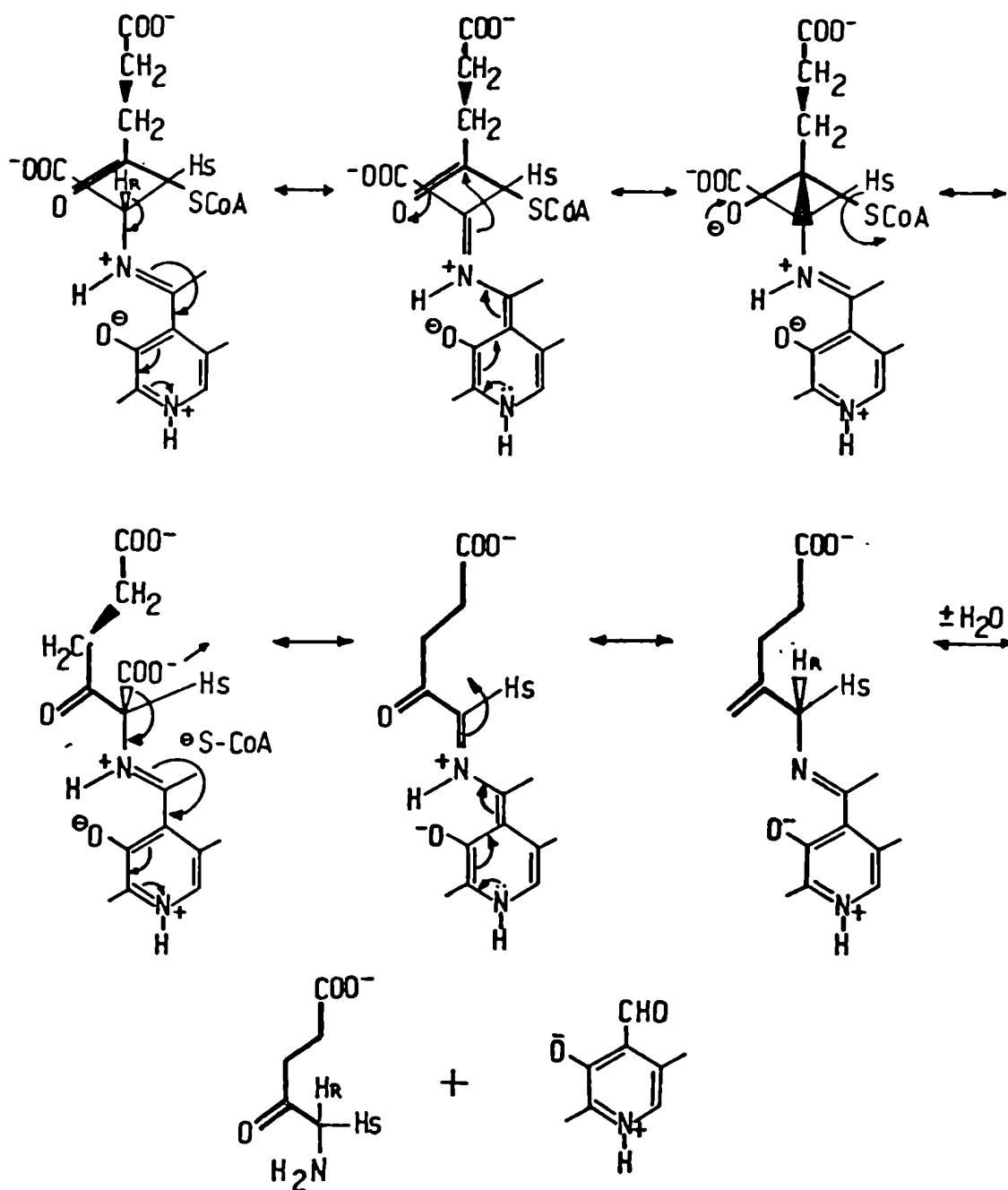


FIGURA IV.4.: Mecanismo químico propuesto para el ALA-S de *Rp. spheroides* (Nandi, 1978 b). Las uniones dibujadas con trazos gruesos, representan la posición detrás del plano.

También en este mecanismo se tiene en cuenta la rotación del carbono  $\alpha$  de la glicina que acompaña la eliminación de CoA, para que el grupo carboxilo quede fuera del plano, posición necesaria para la decarboxilación. La base que originalmente acepta el protón  $H_R$  de la glicina probablemente sea la misma que luego dona el protón  $H_P$  del producto, aunque los estudios de Zaman y col (1973) demuestran que durante la reacción este protón se equilibra con el agua.

#### IV.6. INDUCCION

##### IV.6.1. Porfiria química o experimental

En 1963, Granick y Urata, analizando los efectos de compuestos que inducían porfiria química o experimental en animales, observaron que en estos casos, se producía primero un gran aumento en la producción de ALA-S.

Cuando a un cobayo se le administraba 3,5-dicarbeto-xi - 4-dihidrocolidina (DDC) en una dosis de 1 a 2 gramos durante 2 días, se observaba que la actividad de ALA-S estaba 20 a 40 veces aumentada en la mitocondria hepática y se acumulaban ALA, PBG y porfirinas en hígado y orina.

##### IV.6.2. Compuestos químicos que inducen al ALA-S

Actualmente se conocen una amplia variedad de compuestos orgánicos, que difieren en sus actividades fisiológicas, capaces de inducir porfiria.

Los compuestos más activos para la inducción tienen las siguientes propiedades:

- Son moléculas liposolubles.
- Son no-planares
- Si contienen ésteres o amidas, estos grupos están estéricamente ocultos.

Desde el punto de vista de su estructura, los compuestos inductores pueden dividirse en cuatro clases: colidinas,

esteroides, barbituratos y otros (Granick, 1966).

- Colidinas

Marks (1969) estudió la relación entre la actividad inductora y la estructura de estos compuestos. Los más activos son no-planares y tienen estéricamente ocultos los grupos ésteres y amidas. Esta disposición estérica puede proteger a estas moléculas de las enzimas hidrolíticas que los convertirían en reactivos más solubles en agua y por lo tanto menos eficientes como inductores.

- Esteroides

De todos los inductores conocidos, los esteroides son los únicos que se encuentran en las fuentes fisiológicas (Granick y Kappas, 1967; Kappas y Granick, 1968). Además ciertas observaciones clínicas (De Matteis, 1967) sugieren que durante la pubertad, embarazo y menstruación, es decir períodos en los cuales se producen cambios significativos en la producción de esteroides, los síntomas en las porfirias hepáticas se agudizan o disminuyen.

Los requerimientos estructurales para la inducción del ALA-S por los esteroides son: a) configuración preferencial  $5\beta$ -H; los  $5\alpha$ -H son menos potentes (Sassa y col, 1979); b) esteroides totalmente saturados de 19 ó 21 átomos de carbono (o cadenas aún más largas); c) sustituyentes alcohol y carbonilo en los  $C_3$ ,  $C_{17}$  y  $C_{20}$  y posiblemente en  $C_{11}$ .

- Terpenos

Al igual que los esteroides son derivados isoprenos, aunque las moléculas de los terpenos son mucho más simples. La propiedad básica para que estos compuestos puedan inducir al ALA-S es que posean estructuras no-planares, hidrofóbicas y que contengan un carbonilo como grupo polar (Granick y Sassa, 1971).

- Otros compuestos

Esta clase incluye compuestos halogenados aromáticos tales como hexaclorobenceno, pentaclorofenol y derivados que son frecuentemente usados como fungicidas (Stricky y Koeman, 1979).

Los policlorobifenilos, tóxicos industriales ampliamente

difundidos, son también potentes inductores (Kawanishy y col, 1981) del ALA-S. Kawanishy y col (1981) han determinado la relación entre posición de los sustituyentes y aumento de la actividad del ALA-S.

También algunos compuestos halogenados alifáticos tales como el diisopropil-fluorofosfato (DFP) (Granick y Sassa, 1971) producen marcada inducción de la biosíntesis de porfirinas.

#### IV.6.3. Factores que afectan la inducción del ALA-S

Los reactivos químicos que inducen al ALA-S pueden ser detoxificados, o los compuestos inactivos pueden ser convertidos en inductores, por los sistemas metabolizantes de drogas del hígado. En general, los compuestos más activos como inductores son lipofílicos. Por detoxificación tales compuestos son convertidos en formas hidrosolubles para ser finalmente excretados. El sistema oxigenasa microsomal puede oxidar un inductor activo, agregándole grupos hidroxilos transformándolo en otro menos lipofílico. Tales grupos hidroxilos, a su vez, pueden ser glucuronizados o conjugados, y en esta forma finalmente el compuesto químico es excretado vía biliar u orina (Conney, 1967).

Los ésteres y amidas, que se encuentran estéricamente ocultos dificultan la hidrólisis de dichos grupos, y probablemente retienen de esta forma por más tiempo su capacidad inductora (por ejemplo, el DDC) (Marks, 1969). Las enzimas que saturan los dobles enlaces de esteroides como la progesterona y las que oxidan grupos hidroxilos a cetos en esteroides y terpenos, convertirán compuestos con poca acción inductora en buenos inductores para la síntesis de ALA-S.

#### IV.6.4. Mecanismo de inducción

De Matteis (1978) y Elder (1980) sugirieron que los inductores químicos disminuyen el pool de hemo regulatorio el cual normalmente reprime la síntesis de la enzima. El agotamiento del pool de hemo regulatorio, se ha atribuido a la destrucción del hemo (por ejemplo por 2-alil-2-isopropilacetamida: AIA) y a la incorporación de hemo en el citocromo P-450. Recientemente Lim y col (1980) descubrieron que en hígado de embrión de pollo,

2-propil-2-isopropilacetamida y alil-isopropilacetamida, inducen al ALA-S y producen una disminución inicial en el citocromo P-450 hepático microsomal. Los autores propusieron que todos los reactivos que inducen la síntesis del ALA-S originan una disminución inicial del hemo del citocromo P-450. Por el contrario, Krupa y col (1974) habían encontrado que alil-isopropilacetamida, pero no propil-isopropilacetamida, causaba una disminución detectable en el citocromo P-450 hepático de hígado de embrión de pollo. Sinclair y col (1981) no confirmaron los datos de Lim y concluyeron que la propil-isopropilacetamida no causaba una disminución detectable del citocromo P-450 aunque producía una rápida inducción del ALA-S. El mecanismo por el cual ocurre dicha inducción permanece aún sin dilucidar.

REFERENCIAS

- Abboud, M.M.; Jordan, P.M. & Akhtar, M. (1974) Chem. Commun., p. 643.
- Akhtar, M. & Jordan, P.M. (1968) Chem. Commun., p. 1691.
- Akhtar, M. & Jordan, P.M. (1969) Tetrahedron Lett. p. 875.
- Akhtar, M.; El-Obeid, H.A. & Jordan, P.M. (1975) Biochem. J. 145, 159.
- Akhtar, M.; Abboud, M.M.; Barnard, G.; Jordan, P. & Zaman, Z. (1976) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 273, 117.
- Aoki, Y. (1978) J. Biol. Chem. 253, 2026.
- Aoki, Y.; Wada, O.; Urata, G.; Takaku, F. & Nakao, K. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 568.
- Barreiro, O.L.C. (1967) Biochim. Biophys. Acta 139, 479.
- Beale, S.I. (1971) Plant Physiol. 48, 316.
- Beale, S.I.; Foley, T. & Dzelzkalns, V. (1981) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 1666.
- Brigs, D.W.; Condie, L.W.; Sedman, R.M. & Tephly, T.R. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4996.
- Brown, E.G. (1958 a) Biochem. J. 70, 313.
- Brown, E.G. (1958 b) Nature 182, 313.
- Burnham, B.F. (1962) Biochem. J. 84, 15P.
- Burnham, B.F. (1968) en "Metabolic Pathways" 3rd. Edition (Ed. D.M. Greenberg) Academic Press, New York. 3, 403.
- Burnham, B.F. (1970) Methods Enzymol. 17 A, 195.
- Burnham, B.F. & Lascelles, J. (1963) Biochem. J. 87, 462.
- Castelfranco, P.A. & Jones, O.T.G. (1975) Plant Physiol. 55, 485.
- Condie, L.W.; Baron, J. & Tephyly, T.R. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 172, 123.
- Conney, A.H. (1967) Pharmacol. Rev. 19, 317.
- De Matteis, F. (1967) Pharmacol. Rev. 19, 523.
- De Matteis, F. (1978) Handb. Exp. Pharmacol. 44, 129.



- Duranton, J.; Galmiche, J.M. & Roux, E. (1958) C.R. Acad. Sci. 246, 992.
- Dzelzkalns, V.; Foley, T. & Beale, S. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 216, 196.
- Elder, G.H. (1980) en "Iron in Biochemistry and Medicine II" (Eds. A. Jacobs and M. Worwood), Academic Press, New York, p. 245.
- Falk, J.E. (1964) en "Porphyrins and Metalloporphyrins" Elsevier, New York,.
- Fanica-Gaignier, M. & Clément-Metral, J.D. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 192.
- Fanica-Gaignier, M. & Clément-Metral, J. (1973 a) Eur. J. Biochem. 40, 19.
- Fanica-Gaignier, M. & Clément-Metral, J. (1973 b) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 610.
- Feldman, F. & Lichtman, H.C. (1967) Biochim. Biophys. Acta 141, 653.
- Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1963 a) Nature: 199, 1093.
- Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1963 b) Comp. R. Soc. Biol. 157, 117.
- Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1965) Nature 207, 640.
- Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1973 a) Biomedicine 18, 240.
- Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1973 b) Enzyme 16, 101.
- Gassman, M.L. (1967) PhD Thesis. Univ. Chicago, Ill. 86 p.
- Gibson, K.D. (1958) Biochem. Biophys. Acta 28, 451.
- Gibson, K.D.; Laver, W.G. & Neuberger, A. (1958) Biochem. J. 70, 71.
- Gibson, K.D.; Mathew, M.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1961) Nature 192, 204.
- Graffon, H. (1934) Biochem. Z. 269, 447.
- Granick, S. (1959) Plant Physiol. 34 Supl: XVIII.
- Granick, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 1359.
- Granick, S. & Kappas, A. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4587.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1119.

- Granick, S. & Sassa, S. (1971) en "Metabolic Regulation" (Ed. H.J. Vogel) Metabolic Pathways, Academic Press. New York 5, p. 77.
- Granick, S. & Urata, G. (1963) J. Biol. Chem. 238, 821.
- Hayashi, N.; Yoda, B. & Kikuchi, G. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 131, 83.
- Higuchi, M.; Ohba, T.; Sakai, H.; Karushima, Y. & Kikuchi, G. (1968) J. Biochem. (Tokyo) 64, 795.
- Irving, E.A. & Elliot, W.H. (1969) J. Biol. Chem. 244, 60.
- Jordan, P.M. & Akhtar, M. (1970) Biochem. J. 116, 277.
- Jordan, P.M. & Shemin, D. (1972) Enzyme 7, 339.
- Kaplan, B. (1971) Biochim. Biophys. Acta 235, 381.
- Kappas, A. & Granick, S. (1968) J. Biol. Chem. 243, 346.
- Kawanishy, S.; Seki, Y. & Sano, S. (1981) FEBS Lett. 129, 93.
- Kikuchi, G.; Shemin, D. & Bachman, B.J. (1958 a) Biochim. Biophys. Acta 28, 219.
- Kikuchi, G.; Kumar, A.; Talmage, P. & Shemin, D. (1958 b) J. Biol. Chem. 233, 1214.
- Krupa, V.; Creighton, J.C.; Freeman, M. & Marks, G. S. (1974) Can. J. Physiol. Pharmacol. 52, 891.
- Labbe-Bois, R. & Volland, C. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 179, 565.
- Laghai, A. & Jordan, P.M. (1976) Biochem. Soc. Transac. 4, 52.
- Lascelles, J. (1956) Biochem. J. 62, 78.
- Lascelles, J. (1960) J. Gen. Microbiol. 23, 487.
- Lascelles, J. (1964) en "Tetrapyrrole biosynthesis and its regulation" Benjamin, New York.
- Laver, W.G.; Neuberger, A. & Underfriend, S. (1958) Biochem. J. 70, 4.
- Laver, W.G.; Neuberger, A. & Scott, J.J. (1959) J. Chem. Soc. p. 1483.
- Lim, L.K.; Srivastava, G.; Brooker, J.D.; May, B.K. & Elliot, W.H. (1980) Biochem. J. 190, 519.
- Manetas, Y. & Akayunoglu, G. (1975) Plant Sci. Lett. 5, 375.

- Marks, G.S. (1969) en "Heme and Chlorophyll". Van Nostrand, New York.
- Marriott, J. (1968) en "Porphyrins and related compounds" (Ed. Goodwin, T.W.) Academic Press, London, p. 61.
- Marriott, J.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1969) *Biochem. J.* 111, 385.
- Marriott, J.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1970) *Biochem. J.* 117, 609.
- Marver, H.S.; Tschudy, D.P.; Perlroth, D.P. & Rechcigl, M. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 4323.
- Marver, H.S. ; Strand, G.; Swanson, W.; Manning, F. & Branchaud, R. (1972) *Anal. Biochem.* 47, 457.
- Matthew, M. & Neuberger, A. (1963) *biochem. J.* 87, 601.
- Menon, I.A. & Shemin. D. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 304.
- Miyagi, K. & Watson, C. (1972) *Blood* 39, 13.
- Nakakuki, M.; Yamauchi, K.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1738.
- Nandi, D.L. (1978 a) *Arch. Biochem. Biophys.* 188, 266.
- Nandi, D.L. (1978 b) *J. Biol. Chem.* 253, 8872.
- Nandi, D.L. & Shemin, D. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2278.
- Neuberger, A. (1961) *Biochem. J.* 78, 1.
- Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 178, 607.
- Ohashi, A. & kikuchi, G. (1979) *J. Biochem.* 85, 239.
- Osanai, M. & Rembold, H. (1974) *Happe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355, 327.
- Paterniti, J.R. jr. & Beattie, D.S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6112.
- Patton, G.M. & Beattie, D.S. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 4467.
- Perlroth, M.G.; Tschudy, D.P.; Marver, H.S.; Berard, C.W.; Zeigel, R.F.; Rechcigl, M. & Collins, A. (1966) *Am. J. Med.* 41, 149.
- Porra, R.J. & Grimme, R.H. (1973) *Enzyme* 16, 115.

- Porra, R.J. & Grimme, L.H. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 164, 312.
- Porra, R.J. & Irving, E.A. (1970) Biochem. J. 116, 42P.
- Porra, R.J.; Irving, E.A. & Tennick, A.M. (1972 a) Arch. Biochem. Biophys. 148, 37.
- Porra, R.J.; Irving, E.A. & Tennick, A.M. (1972 b) Arch. Biochem. Biophys. 149, 563.
- Ramaswamy, N.K. & Nair, P.M. (1973) Biochim. Biophys. Acta 293, 269.
- Rhee, K.S. & Plapp, F.W. jr. (1975) Pestic. Biochem. Physiol. 5, 412.
- Sassa, A. & Kappas, A. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2428.
- Sassa, A.; Bradlow, L. & Kappas, A. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10011.
- Schulman, M.P. & Richert, D.A. (1957) J. Biol. Chem. 226, 181.
- Shemin, D. (1957) Ergeb. Physiol. 49, 299.
- Shemin, D. & Bray, R.C. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. 112, 615.
- Shemin, D. & Russell, C.S. (1953) J. Am. Chem. 215, 613.
- Simpson, D.M. & Beattie, D.S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1630.
- Sinclair, P.R.; Healey, J.F.; Sinclair, J.F. & Bonkowsky, H.L. (1981) Biochem. J. 200, 709.
- Strick, J.J. T.W.A. & Koeman, J.H. (1979) en "Chemical Porphyrin in man" (Ed. Elsevier, North Holland) Biomedical Press.
- Tait, G.H. (1968) en "Porphyrins and related compounds (Ed. T. W. Goodwin) New York, Academic p.174.
- Tait, G.H. (1973) Biochem. J. 131, 389.
- Tomio, J.M. & Grinstein, M. (1968) Eur. J. Biochem. 6, 80.
- Troxler, R.F. & Lester, R. (1967) Biochemistry 6, 3840.
- Tschudy, D.P.; Perlroth, M.G.; Marver, H.S.; Collins, A. & Hunter, G. jr. (1965) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 53, 841.
- Tuboi, S.; Kim, J.H. & Kikuchi, G. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 130, 92.
- Urata, G. & Granick, S. (1963) J. Biol. Chem. 238, 811.

- Viale, A.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 729.
- Vogel, W.; Richert, D.A.; Pixley, B.Q. & Schulman, M.P. (1960) J. Biol. Chem. 235, 1769.
- Warnick, G.R. & Burnham, B.F. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6880.
- Whiting, M.J. & Elliot, W.H. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6818.
- Whiting, M.J. & Granick, S. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1340.
- Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A.M. del C. & Tigier, H. (1971) Biochim. Biophys. Acta 235, 511.
- Wider de Xifra, E.A.; Sandy, J.D.; Davies, R.C. & Neuberger, A. (1976) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 273, 79.
- Wintrobe, M.M. (1950) Harvey Lectures 45, 87.
- Woods, J.S. (1974) Mol. Pharmacol. 10, 389.
- Yamamoto, M.; Hayashi, N. & Kikuchi, G. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. 105, 985.
- Yubisui, T. & Yoneyama, Y. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 150, 77.
- Yubisui, T.; Takeshita, M. & Yoneyama, Y. (1976) Experientia 32, 859.
- Zaman, Z.; Jordan, P.M. & Akhtar, M. (1973) Biochem. J. 135, 257.

## CAPITULO V

### RODENASA

---

	Página
V.1. Introducción	102
V.2. Distribución biológica	103
V.2.1. Fuentes animales	103
V.2.2. Fuentes vegetales y microbiológicas	105
V.3. Propiedades catalíticas	108
V.3.1. Especificidad de sustrato	108
V.3.2. Actividad de tiosulfato reductasa	113
V.3.3. Inhibición y activación	114
V.4. Propiedades proteicas	119
V.4.1. Estructura primaria	119
V.4.2. Estructura secundaria y terciaria	122
V.4.3. Estructura cuaternaria	126
V.5. Mecanismo de acción	128
V.5.1. Mecanismo cinético	128
V.5.2. Mecanismo químico	137
V.6. Funciones biológicas	142
V.6.1. Detoxificación de cianuro y sulfuro inorgánico	143
V.6.1.1. Interpretación convencional	144
V.6.1.2. Interpretación modificada. Pool de azufre sulfano	146
V.6.1.21 Reacciones catalizadas por enzimas que usan o producen azufre sulfano	148

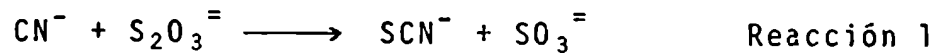


	Página	
V.6.1.211	Utilización de azufre sulfano	148
V.6.1.211.1.	Rodenasa (tiosulfato sulfo- transferasa)	148
V.6.1.211.2.	Tiosulfato reductasa	149
V.6.1.212.	Producción de azufre sulfano	151
V.6.1.212.1.	3-Mercaptopiruvato sulfotrans_ ferasa	152
V.6.1.212.2.	$\gamma$ -Cistationasa (Cistationasa $\gamma$ -liasa)	154
V.6.1.213.	Metabolismo de pesticidas y sulfanos	156
V.6.1.22	Toxicidad por agotamiento de azufre sulfano	157
V.6.1.221.	El problema de la mandioca	157
V.6.1.222.	Interrelaciones nutricionales	158
V.6.2.	Transferencia de azufre sulfano a otras proteínas	159
V.6.2.1.	Formación de azufre "lábil" en ferroproteínas no hémicas a partir de tiosulfato	159
V.6.2.2.	Interacción entre rodenasa y succinato-deshidrogenasa	160
V.6.2.3.	Activación de malato-deshidro_ genasa por rodenasa	162
V.6.2.4.	Interacción entre rodenasa y ALA-S	163
Referencias		164

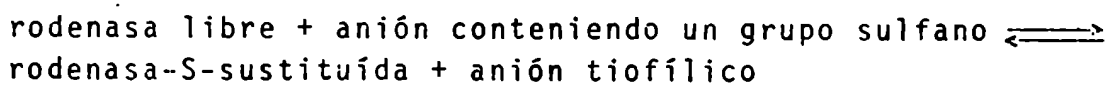
## V. RODENASA

### V.1. INTRODUCCION

Lang (1933 a, b) demostró la conversión enzimática del ion cianuro en sulfocianuro menos tóxico, asignando el nombre de rodenasa para la enzima involucrada en esta catálisis (Reacción 1)



Actualmente la reactividad específica de la rodenasa puede ser descripta en términos de la siguiente reacción:

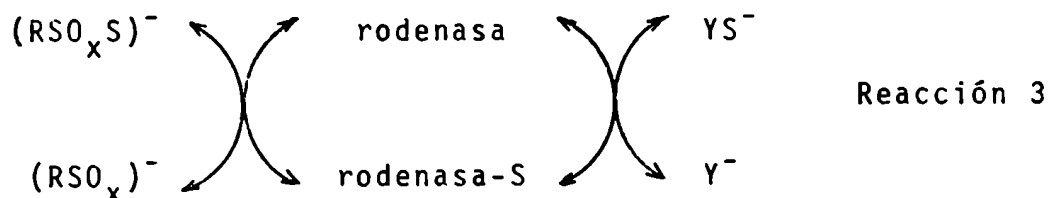


Reacción 2

Esta reacción general permite comprender el mecanismo catalítico y el rol fisiológico de la enzima.

En este sistema la rodenasa, como todas las enzimas que funcionan por mecanismos de doble desplazamiento, pertenece a un grupo de proteínas "carrier" que reacciona alternativamente con sustratos que poseen grupos donores y aceptores.

Por lo tanto, en todo sistema de reacción que contenga además de rodenasa, un anión con un grupo sulfano  $(\text{RSO}_x\text{S})^-$  y un anión tiofílico no relacionado  $(\text{Y}^-)$ , se establece el siguiente ciclo catalítico (Reacción 3)



donde x vale 0, 1 ó 2 y R puede ser un radical orgánico, un átomo de hidrógeno u oxígeno.

Los sustratos donores de azufre pueden ser: disulfonatos, persulfuros y polisulfuros. Los sustratos aceptores son: cianuro, sulfito, sulfonatos orgánicos, tioles y ditiolles, borohidruro y ditionito. Muchas de las reacciones catalizadas por



rodenasa, en las cuales los compuestos mencionados reaccionan como sustratos, son totalmente reversibles, como se indicó en las Reacciones 2 y 3. Sin embargo, la mayoría de estas combinaciones no se han investigado aún en detalle y la Reacción 1, la primera y más extensamente estudiada de las de esta serie, es atípica en este aspecto, ya que la formación de tiocianato es irreversible.

Para que la actividad catalítica de la rodenasa se manifieste, es esencial que la enzima reaccione con los átomos sulfanos de los sustratos donores por clivaje enzimático de las uniones disulfuro. Un factor importante en la ruptura de tales uniones es la fuerza nucleofílica del grupo atacante.

## V.2. DISTRIBUCION BIOLOGICA

Los estudios iniciales sobre la rodenasa (Lang, 1933 a, b), se originaron a partir del descubrimiento de su acción detoxificante del cianuro *in vivo* (Lang, 1894 y 1895). Posteriormente se determinó su actividad en varias fuentes biológicas.

### V.2.1. Fuentes animales

El trabajo original de Lang (1933 a, b) sobre rodenasa menciona una gran variedad de tejidos mamíferos y algunos estudios con ranas, pájaros y *E. coli*.

Todos los tejidos mamíferos presentaban actividad enzimática; en caninos, era alta en adrenales e hígado y muy baja en sangre y músculo. Entre los animales estudiados la actividad era mayor en ranas, seguida por conejos y ganado vacuno. En los seres humanos, gallinas, gatos y *E. coli* los niveles eran más bajos.

Lang también reportó que su preparación de rodenasa de hígado, purificada alrededor de 20 veces a partir de polvos cetónicos, catalizaba la formación de tiocianato usando como donador de azufre tiosulfato o azufre elemental.

Trabajos posteriores de Cosby y Summer (1945), Himwich y Saunders (1948), Bénard y col (1948 a, 1949) y Saunders y Himwich (1950), confirmaron el trabajo original de Lang, encon

trando además gran diferencia entre las diversas especies y órganos. En general, el hígado es el tejido en el que se detecta mayor actividad, aunque en perros a diferencia de otras especies, las adrenales se encuentran especialmente activas.

Los riñones de mamíferos son menos ricos en rodenasa que el hígado. También se encontró actividad enzimática en ciertas regiones del cerebro (alrededor de un 10% de la estimada para el hígado). Villarejo y Westley (1963 a) estudiaron la distribución de la enzima en órganos bovinos y encontraron que respecto a los niveles de actividad en hígado, los riñones tenían un 50% y las adrenales sólo poseían un 2,5%.

Contrariamente a lo que ocurre con la rodenasa cristalina de hígado bovino, las preparaciones crudas no utilizan azufre elemental como sustrato (Sörbo, 1953 a).

Coltorti y Giusti (1956 a) midieron la actividad de rodenasa en eritrocitos; a diferencia de los resultados de Lang, encontraron alrededor del 2,5% de la actividad en hígado. Bajos niveles de actividad enzimática se reportaron también en larvas, ninfas y adultos de moscarda (Parsons y Rothschild, 1962). El contenido de rodenasa de estos animales enteros, es solamente del orden de 1 a 2% del valor en hígado bovino.

Más recientemente, Schievelbein y col (1969) determinaron la cantidad de rodenasa en varios tejidos de un amplio espectro de especies. La mayoría de los animales terrestres tienen mayor actividad en hígado y riñones, mientras que los animales marinos presentan su máxima actividad en branquias. En general, la actividad de rodenasa varía de una clase a otra, pero es relativamente constante en especies de la misma clase.

Varios investigadores estudiaron muy cuidadosamente la localización intracelular de rodenasa en hígado mamífero. Ludwig y Chanutin (1950) demostraron que menos del 1% de la rodenasa de hígado estaba asociada al tejido conectivo. La mayor parte de la actividad del hígado está en la fracción mitocondrial. Sörbo (1951 a) también estudió la distribución subcelular de la enzima y concluyó que la rodenasa es una enzima mitocondrial. DeDuve y col (1955), en un estudio detallado diferenciaron lisosomas de mitocondrias, corroborando que la rodenasa se encuentra solamente en la fracción mitocondrial.

Para los vertebrados la distribución subcelular de rodenasa depende del proceso de evolución; observándose que la enzima de hígado aumenta su actividad y sufre un proceso de translo-

cación del citoplasma a la mitocondria cuando se pasa de peces, anfibios y reptiles a pájaros y mamíferos (Dudek y col, 1979).

Posteriormente Agnisola y col (1981) estudiaron la distribución enzimática en homogenato y hialoplasma de preparados a partir de tres tejidos (bránquias, glándula digestiva y riñón) de cuatro especies de cefalópodos. La actividad de rodenasa es mayor en octópodos que en decápodos y su patrón de distribución es diferente en cada especie; la presencia de la enzima en órganos estructural y funcionalmente diferentes, sugiere el carácter ubicuo de la misma; además en cefalópodos la actividad parece ser, al menos parcialmente hialoplasmática.

Existen pocos trabajos sobre estudios de rodenasa en los distintos tejidos humanos. Jarabak y Westlley (1974 a) purificaron la enzima de hígado y la compararon con la rodenasa purificada de hígado bovino. Ambos mostraban diferencias en sus actividades específicas, absorción U.V. y comportamiento cinético. Los datos indican que las dos proteínas no son idénticas. La enzima de humanos a diferencia de la rodenasa de bovinos, presenta activación por el sustrato aceptor cianuro.

Para explicar dicha activación se postuló la existencia de una forma isomérica de la enzima sustituida.

Scott y Wright (1980 a) estudiaron distintos aspectos de la enzima de eritrocitos humanos. Por un lado investigaron el polimorfismo genético de la rodenasa. La enzima es monomórfica en la mayoría de las poblaciones ensayadas pero es polimórfica en dos grupos lingüísticos de indios.

Por otro lado, demostraron por electroforesis que las actividades de rodenasa y  $\beta$ -mercaptopiruvato sulfotransferasa de glóbulos rojos humanos hemolizados eran el producto del mismo gen. Las dos actividades de esta enzima se purificaron juntas y la actividad de rodenasa correspondió a una fracción menor de la  $\beta$ -mercaptopiruvato sulfotransferasa de eritrocitos.

#### V.2.2. Fuentes vegetales y microbiológicas

Gemeinhardt (1938 y 1939) detectó por primera vez la actividad de rodenasa en plantas. En microorganismos, Lang (1933 a) midió la enzima en *E. coli*, pero no hubo posteriores trabajos en sistemas microbiológicos hasta el publicado por

Bénard y col en 1948 (b). Estos investigadores, además de hallar actividad enzimática en bacterias, demostraron que la respiración inhibida por cianuro, podía ser reactivada por tratamiento con extracto de hígado y tiosulfato. Posteriormente, en 1954 Castrella Bertran presenta una breve comunicación sobre rodenasa en plantas y en 1958 Mc Chesney detecta la enzima en diferentes especies de *Thiobacillus*.

En 1963 (b), Villarejo y Westley encontraron que la actividad de rodenasa en *E. coli w*, *E. coli K-12* y *Neurospora crassa* era muy baja, aunque se observó una pequeña catálisis no-enzimática de la reacción tiosulfato-cianuro en preparaciones de células rotas de estos microorganismos. En cambio, *Bacillus subtilis*, *B. coagulans* y *B. stearothermophilus* contenían cantidades apreciables de la enzima, alrededor del 15% del nivel en hígado bovino. Posteriormente los mismos autores (Villarejo y Westley, 1966) purificaron unas 70 veces rodenasa proveniente de *B. subtilis*, estudiaron sus propiedades, comprobando gran similitud con la enzima de hígado bovino. La rodenasa de *B. subtilis* parece ser una enzima constitutiva; su actividad específica en células lisadas no pudo aumentarse usando tiosulfato como única fuente de azufre o disminuirse agregando cisteína al medio de crecimiento.

Bowen y col (1965) aislaron rodenasa de *Thiobacillus denitrificans* y estudiaron su mecanismo y propiedades moleculares. Ellos encontraron que el rendimiento de rodenasa a partir de esta bacteria aumentaba considerablemente cuando se agregaba cianuro al medio de crecimiento.

Sargeant y col (1966) también estudiaron el contenido de rodenasa en células de *Thiobacillus denitrificans* crecidas en condiciones anaeróbicas. Existen otros trabajos en varias especies de *Thiobacillus*. LeJohn y col (1967) analizaron el metabolismo energético de *Thiobacillus novellus* en términos de represión de la oxidación del tiosulfato por sustratos energéticos alternativos. Encontraron que lactosa, glucosa, ribosa, glicerol, lactato o piruvato reprimían todas las enzimas, incluyendo la rodenasa, involucrada en la oxidación del tiosulfato en dicho organismo. Posteriormente Tabita y col (1969) purificaron 40 veces la enzima de *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*).

Con respecto a otras fuentes bacterianas, Smith y Las-

celles (1966) comprobaron que extractos de *Chromatium* sp. cepa D, crecidos bajo condiciones anaeróbicas y a la luz, catalizaban la cianólisis del tiosulfato para dar sulfito y tiocianato.

Hall y Berk (1968) demostraron que los extractos de *Pseudomonas aeruginosa* contenían rodenasa, obteniéndose un aumento de actividad del 40% cuando las células crecían en un medio con mercaptosuccinato. En 1978, Schook y Berk hicieron estudios con *Pseudomonas aeruginosa* crecida con distintas fuentes de azufre inorgánico, comprobando que la rodenasa es una enzima constitutiva, que se encuentra en la fracción soluble y que su actividad es independiente del medio de crecimiento empleado.

Yoch (1971) estudió el contenido de rodenasa en representantes de las tres familias de bacterias fotosintéticas: *Thiorhodaceae*, *Athiorhodaceae* y *Chlorobacteriaceae*; encontró actividad de rodenasa en todos estos organismos pero no la correlacionó con el metabolismo del tiosulfato. Barton y Akagi (1971) purificaron a la enzima de *Desulfatomaculum nigrifans* y la separaron de la tiosulfato reductasa.

En 1980, Vandenberg y Berk, purificaron y caracterizaron rodenasa de *Acinetobacter calcoaceticus*. Se determinó que la enzima estaba presente en todas las cepas y especies de *Acinetobacter* estudiadas y su actividad era mayor que en cualquiera de los otros géneros ensayados (Vandenberg y col, 1979).

En los últimos 10 años, se han publicado varios trabajos sobre rodenasa en plantas. Chew y Boey (1972) comprobaron que las hojas de la tapioca *Manihot utilissima* contienen suficiente actividad de rodenasa como para permitir la metabolización de cualquier cianuro libre, que podría formarse *in vivo* por la hidrólisis intracelular del glicósido cianogénico linamarina, que se encuentra en esta planta. Más tarde, se detectó la actividad de la enzima en extractos crudos de hojas de doce especies de plantas seleccionadas al azar; nueve de ellas no-cianofóricas y tres cianofóricas. En todos los casos la actividad medida fue significativa y no se encontró correlación entre dicha actividad y la naturaleza cianofórica de la planta (Chew, 1973).

Finazzi Agró y col (1971) realizaron estudios desde un punto de vista diferente; analizando la capacidad de la rodenasa de transferir azufre como un método apropiado para reacti-

var la ferredoxina cuyo "sulfuro lábil" había sido removido. Tomati y col (1972) efectuaron investigaciones análogas en cloroplastos de espinaca, perejil, repollo y nabo. Los resultados obtenidos mostraron una evidente correlación entre la actividad de rodenasa y el contenido de azufre lábil.

### V.3. PROPIEDADES CATALITICAS

Se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre la actividad de rodenasa para dilucidar las propiedades de la enzima como proteína y su mecanismo catalítico. La mayoría de estos trabajos se realizaron con la enzima cristalina de hígado bovino (Sörbo, 1953 b) y los estudios comparativos efectuados con la enzima cristalina de riñón bovino (Westley, 1959; Westley y Green, 1959) revelaron que no existen diferencias entre ambas.

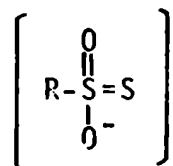
#### V.3.1. Especificidad de sustrato

Durante 20 años se pensó que la rodenasa tenía solamente dos sustratos: tiosulfato como donador y cianuro como aceptor. Lang (1933 a y b) en su reporte original mencionó que el azufre coloidal también podía servir como donador pero se demostró que esto no era válido para la enzima altamente purificada (Sörbo, 1953 a). Al principio se creyó que una segunda enzima llamada "rodenasa S" era responsable de la actividad medida con azufre coloidal (Sörbo, 1953 a). Sin embargo, más tarde Sörbo (1954) indicó que se trataba de una reacción no-específica que involucraba la formación de un polisulfuro proteína y su posterior cianólisis.

El informe original de Lang (1933 a y b) sobre la formación irreversible de sulfocianuro a partir de tiosulfato y cianuro, ha sido confirmado y ampliado por otros autores (Sörbo, 1953 b; Goldstein y Rieders, 1953; Davis, 1962). Chung y Wood (1970, 1971) demostraron que la generación de cianuro a partir de sulfocianuro, que ocurre en los sistemas metabólicos, es una reacción oxidativa que involucra peróxido de hidrógeno, actuando como catalizadores peroxidasa o hemoglobina.

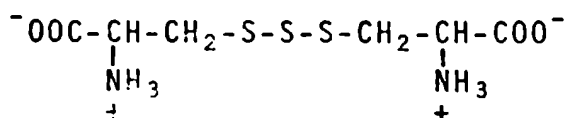
En 1953 se sugirió que el mercaptopiruvato podía actuar como sustrato donador de azufre para rodenasa (Wood y Fiedler, 1953). En 1964, Sörbo demostró que este compuesto no servía como donador para la enzima cristalina. Sin embargo, la primera hipótesis fue posteriormente confirmada al descubrirse dos formas moleculares de rodenasa, con distinta carga (Blumenthal y Henrikson, 1971). La actividad detectada para el mercaptopiruvato es solamente 1% de la medida con tiosulfato como sustrato donador, y tal pequeña magnitud podría haber sido no detectada en trabajos anteriores (Sörbo, 1964). Por otro lado, a menos que se tomaran grandes precauciones para asegurar la ausencia de trazas de azufre polisulfuro en el mercaptopiruvato usado, la observación de esa baja actividad era indudablemente difícil de interpretar.

Éxiste una serie bien establecida de donadores de azufre distintos al tiosulfato. Sörbo (1953 a y b) y Eriksson y Sörbo (1967) determinaron que los tiosulfonatos de la forma



son capaces de actuar como donadores, frente al cianuro como sustrato aceptor. Más tarde, se comprobó que el sulfito también puede funcionar como aceptor formándose en este caso tiosulfato (Sörbo, 1957 a). Los tiosulfonatos pueden pensarse como derivados del tiosulfato en el cual uno de los átomos de oxígeno ionizable es reemplazado por un residuo orgánico. Se sintetizan a partir de los correspondientes haluros de sulfonilo y sulfuros o a partir de ácidos sulfínicos y azufre elemental (Traeger y Linde, 1901; Cavallini y col, 1963; Mintel y Westley, 1966 a ; Westley y Heyse, 1971).

Sörbo (1960) también comprobó que una mezcla de polisulfuros inorgánicos, principalmente disulfuros, constituyen un buen sistema donador para transferir azufre al cianuro en la reacción catalizada por rodenasa. Szczepkowski (1961) demostró que la rodenasa formaba tiosulfato, utilizando un disulfuro como donador y sulfito como aceptor. Finalmente Szczepkowski y Wood (1967) verificaron que el trisulfuro "tiocistina" puede actuar como sustrato donador



De estos estudios resulta evidente que todos los donores de azufre contienen átomos de azufre sulfano y que estos átomos sulfanos son los transferidos a los sustratos aceptores.

Los sulfanos son compuestos que contienen una cadena lineal de átomos de azufre todos en el nivel sulfonilo de oxidación y unidos unos a otros, excepto el átomo de azufre terminal que se encuentra unido a un solo átomo de hidrógeno. También se denomina "sulfano" al átomo de azufre más externo de los tiosulfatos y tiosulfonatos, los átomos de las cadenas internas de los politionatos y los polisulfuros orgánicos, el átomo de azufre terminal de los hidrosulfuros orgánicos (persulfuros) y por supuesto todos los átomos de azufre de los di y polisulfuros inorgánicos (Figura V.1.).

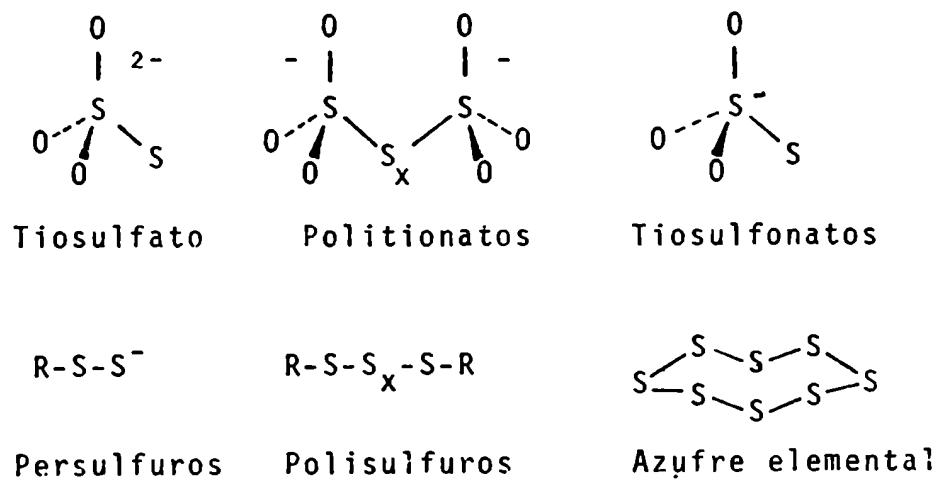


FIGURA V.1.: Compuestos con átomos de azufre sulfano que existen en sistemas biológicos.

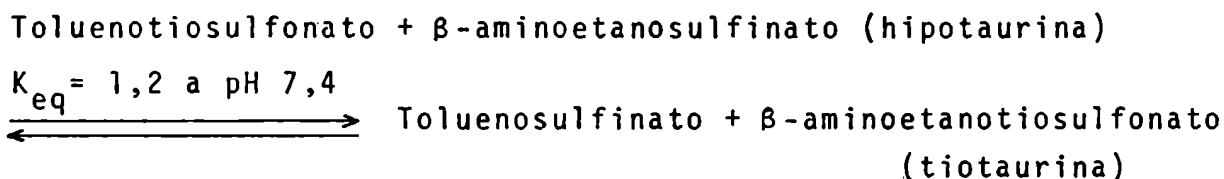
Actualmente se acepta que todos los sustratos donores efectivos deben ser aniones netos, por lo menos en parte, a los valores de pH de los medios de incubación que se utilizan para medir la actividad de rodenasa.

Cuando se compararon las velocidades de transferencia del azufre catalizada por rodenasa a partir de etanotiosulfonato y  $\beta$ -aminoetanotiosulfonato (tiotaurina) se comprobó que existían diferencias en las mismas al variar el pH, concluyendo que probablemente sólo la forma aniónica neta, y no el zwitterion, del amino-compuesto servía como sustrato (Westley y Heyse, 1971). Estos resultados coinciden con los hallados por Finazzi



Agró y col (1972). Todos estos datos avalan la hipótesis que postula que el sitio de unión de la enzima para el donor contiene un grupo catiónico (Mintely y Westley, 1966 b; Leininger y Westley, 1968).

Todos los aceptores para rodenasa son aniones tiofílicos. Además del clásico cianuro (Lang, 1933 a), también actúa como tal el sulfito (Szczepkowski, 1961; Eriksson y Sörbo, 1967). Sörbo (1962 a) comprobó que la rodenasa cataliza la reacción de intercambio isotópico entre  $^{35}\text{SO}_3^{2-}$  y  $\text{SSO}_3^{2-}$ . También se encontró que los alquil y aril sulfinatos ( $\text{RSO}_2^-$ ) eran sustratos activos (Sörbo, 1962 a). Cuando estos compuestos se usan como aceptores las reacciones totales son reversibles. Los sistemas de reacción conteniendo un aril tiosulfonato y un alquil sulfonato, o viceversa, llegan rápidamente a un equilibrio en presencia de rodenasa, por ejemplo:



Conociendo el grado de tiofilicidad de los tioles, podría esperarse que éstos funcionen como sustratos aceptores, con formación de los correspondientes persulfuros ( $\text{RSS}^-$ ) como productos. Sörbo (1962 a) midió la actividad enzimática frente a diversos sulfuros inorgánicos, cisteína, cisteamina y glutatión; éstos resultaron inactivos, y cuando utilizó mercaptoetanol y tioglicolato, con p-toluenosulfonato como donor, la reacción fue lenta y los productos no fueron identificados.

En 1963, Villarejo y Westley (a, b) reportaron los resultados de los estudios sobre la actividad de tiosulfato reductasa de rodenasa, en los cuales una variedad de agentes reductores, incluyendo cisteína y glutatión, no servían como sustratos. En estos estudios, sin embargo, los ditioles lipoato, lipamida y 2,3-dimercaptopropanol (BAL) resultaron activos, produciendo  $\text{SO}_3^-$  y  $\text{HS}^-$  a partir de  $\text{SSO}_3^{2-}$  en la reacción catalizada por rodenasa. Posteriormente Koj (1968) y Sido y Koj (1972) demostraron que la cisteína y el glutatión pueden servir como sustratos aceptores, pero la velocidad de reacción fue baja

(2-3,5 % de la obtenida con cianuro) y no se pudo establecer una relación lineal entre la velocidad y la concentración de enzima, quizás debido a la alta reactividad de los persulfuros formados como productos de la reacción.

El borohidruro ( $\text{BH}_4^-$ ) y el ditionito ( $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ ) son otros aniones tiofílicos que resultaron activos en el clivaje reductivo del tiosulfato por rodenasa (Villarejo y Westley, 1963 a y b). Es interesante recalcar que los ditionitos que se oxidan a disulfuros cíclicos con anillos de más de cinco miembros tales como ditionitritol y ditionitritol no son sustratos activos. En realidad, estos compuestos inactivan rápidamente la rodenasa (Volini y Westley, resultados no publicados, reportado por Westley, 1973).

Smith y Lascelles (1966) usando tiosulfato marcado con  $^{35}\text{S}$  en el átomo de azufre interno comprobaron que no había acumulación intracelular de azufre radioactivo y establecieron que la producción de sulfato ocurría principalmente a expensas del átomo de azufre interno ( $\text{SO}_3^-$ ) del tiosulfato. La radioactividad del tiosulfato marcado con  $^{35}\text{S}$  en el átomo de azufre externo se acumulaba dentro de los organismos y era transferida al sulfato a una velocidad que era similar a la velocidad de la segunda fase de producción de sulfato; la mayoría del azufre externo pasaba así a través del estado de azufre interno. Se concluyó que el azufre endógeno es un intermediario en la oxidación del tiosulfato por *Chromatium-D* y el clivaje de la unión S-S en la molécula es el paso limitante en el proceso de oxidación.

Estudios cinéticos comparando al metanotiosulfonato y tiosulfato como sustratos para la rodenasa de hígado bovino confirmaron que el clivaje de la unión disulfuro del tiosulfato limita la velocidad máxima de la reacción de transferencia de azufre entre el tiosulfato y el cianuro, con formación de un complejo enzima-tiosulfato cinéticamente importante (Intel y Westley, 1966 a). En el mismo estudio, se indicó que la constante de Michaelis para el tiosulfato es una verdadera constante de disociación para este complejo.

Silver y Kelly (1976) purificaron rodenasa de *Thiobacillus A<sub>2</sub>*, crecido en un medio que contenía tiosulfato y estudiaron la actividad de la enzima sobre las cuplas tiosulfato con dihidrolipoato y dihidrolipoamida. Cromatográficamente se com-

probó que como consecuencia de dicha reacción se producía  $\alpha$ -lipoato o lipoamida y como intermediarios los persulfuros de dihidrolipoato y dihidrolipoamida, verificándose la importancia biológica de la degradación oxidativa del tiosulfato por un camino biosintético central de conservación de energía.

### V.3.2. Actividad de Tiosulfato Reductasa

Sörbo, en 1964, estudió la actividad de tiosulfato reductasa glutatión dependiente en cortes de hígado. Encontró que la inhibición de la reducción del tiosulfato por arsenito era revertida tan efectivamente por mercaptoetanol como por 2,3-dimercaptopropanol. El autor concluyó que la reductasa dependiente de glutatión, y no la rodenasa, era la responsable primariamente del clivaje reductivo del  $\text{SSO}_3^{2-}$  *in vivo*. Koj (1968) y Sido y Koj (1972) continuaron con estos trabajos y encontraron que la capacidad total de tiosulfato reductasa del homogenato de hígado contenía dos componentes. Uno de éstos, responsable de casi el 35% de la actividad total, coincidía con las propiedades de rodenasa: alto pH óptimo y habilidad para utilizar cianuro, borohidruro o cisteína como aceptores de azufre. El otro componente que representaba el 65% de la actividad total, tenía un pH óptimo bajo y alta especificidad por el glutatión como anión tiofílico. Koj pudo separar físicamente las dos actividades mediante fraccionamiento con sulfato de amonio y acetona, seguido por filtración en gel de Sephadex.

El descubrimiento de la actividad de reductasa asociada a rodenasa dio lugar a importantes estudios cinéticos realizados por Volini y Westley en 1966. Estos autores estudiaron la velocidad inicial de la reacción tiosulfato-lipoato catalizada por rodenasa, como una función de las concentraciones de ambos sustratos a seis valores de pH. Se detectó inhibición competitiva mutua por los dos sustratos y se demostró que era causada por la formación reversible de complejos "dead-end" pues el tiosulfato excluye al lipoato por formación del complejo con la enzima-S-sustituída y el lipoato excluye al tiosulfato por formación del complejo con la enzima libre.

### V.3.3. Inhibición y activación

El trabajo original de Lang sobre rodenasa informaba sobre la inhibición sustancial de la enzima parcialmente purificada de hígado por iones alcalino-térreos. Con  $\text{CaCl}_2$  0,02 M, se producía un 35% de inhibición y se podía incluso detectar este efecto a concentraciones menores (Lang, 1933 a).

Posteriormente Lang (1949) reportó la inhibición de rodenasa por cianuro y sulfito, datos que suscitaron considerable interés. En realidad la enzima era inactivada más que inhibida en presencia de estos reactivos, a menos que el tiosulfato estuviera también presente. En base a estos datos Sörbo (1951 b; 1953 b, c) postuló que en el sitio activo de la enzima había un puente disulfuro.

El hallazgo de Green y Westley (1961) de la rodenasa azufre-sustituída, sumado a la mayor sensibilidad que presentaba la enzima diluída frente al cianuro y al sulfito, llevó a estos autores a sugerir que las inactivaciones causadas por dichos iones en ausencia de tiosulfato simplemente reflejaban la labilidad aumentada de la enzima libre relativa a la forma azufre-sustituída. Estas suposiciones fueron discutidas por Sörbo (1962 b), quien encontró condiciones bajo las cuales la inactivación por  $^{35}\text{SO}_3^{2-}$  era acompañada por la unión del radioisótopo a la proteína. Similarmente, en ciertas condiciones la inactivación por cianuro requería la presencia de oxígeno. Como prueba adicional de que el sulfo-sustrato no se requiere para la estabilidad enzimática, Sörbo (1963 a) citó una experiencia no publicada en la cual la rodenasa bastante concentrada se hizo reaccionar con cianuro y luego se separó el exceso de  $\text{CN}^-$  por intercambio iónico. Luego de este tratamiento, la enzima retenía la mayor parte de su actividad.

Esta controversia se mantuvo durante mucho tiempo hasta que Sörbo (1962 b) estableció que no existía puente disulfuro en la rodenasa nativa. Se determinó también que la presencia de  $\text{SSO}_3^-$  o de su átomo sulfano transferible disminuía la sensibilidad de la rodenasa a una considerable variedad de tratamientos inhibitorios o inactivantes (Davidson y Westley, 1965; Wang y Volini, 1968; De Toma y Westley, 1970), pero el efecto químico exacto del cianuro o del sulfito depende de muchos factores, entre ellos la concentración de proteína y de oxígeno.

Para formular el mecanismo de acción de la rodenasa se consideraron las reacciones de la enzima con los reactivos sulfhidrúlicos.

Saunders y Himwich (1950) reportaron la inhibición por tales reactivos. Sörbo (1951 a) también encontró que una variedad de estos compuestos tenían efectos sobre rodenasa, aunque éstos eran considerablemente más débiles que los observados sobre las "enzimas sulfhidrúlicas" típicas. Sato y Hayashi (1952) detectaron la inhibición de la rodenasa de mamíferos por agentes tiólicos, y lo mismo fue observado por De Ritis y col (1954) y Coltorti y Giusti (1956 b). Los últimos investigadores mencionados comprobaron que la inactivación de rodenasa por N-etilmaleimida podía evitarse preincubando la enzima con  $\text{SSO}_3^{2-}$ .

Sörbo (1963 b) estudió la inactivación de rodenasa por mercuribenzoato y comprobó que se producía una lenta reacción de la enzima con dicho reactivo; llegó a la conclusión, contrariamente a su opinión previa (1953 b y c), que existía un grupo sulfhidrúlico esencial en la rodenasa. Davidson y Westley (1965), sin embargo, fueron incapaces de hallar evidencias sobre la existencia de un grupo sulfhidrúlico, notando que la reacción con mercuribenzoato, por ejemplo, requería condiciones que desestabilizaban la estructura terciaria de la enzima, incluso en ausencia del mercurial.

En 1968, Wang y Volini demostraron completamente la hipótesis de Sörbo sobre los grupos sulfhidrilos esenciales de la rodenasa. Estos investigadores determinaron que la enzima sufría la pérdida completa de la actividad cuando se la trataba con agentes alquilantes, o se la oxidaba a disulfuros mixtos indicando la importancia de los grupos sulfhidrilos para la catálisis. Los análisis efectuados durante el curso de la inactivación con cualquiera de estos reactivos revelaron la pérdida de uno de los dos grupos -SH en el monómero de la rodenasa cuando la inactivación era completa. El análisis de aminoácidos de la enzima inactivada con iodoacetato mostró que la mitad de sus residuos cisteína habían sido carboximetilados. Por medio de experimentos de sedimentación se demostró que la enzima inactivada por dinitrobenzenu era un dímero oxidado, indicando la formación de un puente disulfuro intermolecular entre monómeros. Cuando la enzima inactivada por mercaptoetanol se redujo, se detectaron dos grupos -SH, lo que sugirió la existencia de un disulfuro mixto entre el reac

tivo y la enzima. Por otra parte la inhibición competitiva de la actividad de rodenasa por iones aromáticos, pero no por los correspondientes alifáticos, confirmó evidencias previas sobre la presencia de un residuo triptofano en el centro activo. Resultados posteriores sugirieron la proximidad del sulfhidrilo esencial y el grupo aromático en el sitio activo de la enzima. Más aún, el tratamiento prolongado con tiosulfato revertía totalmente la inactivación y la pérdida del sulfhidrilo debida a la formación del disulfuro, pero no aquellos efectos causados por la alquilación; la extensión de la reactivación y de la recuperación del sulfhidrilo estaban exactamente correlacionadas. En estudios posteriores, se notó la necesidad de remover el sulfato-sustrato de la rodenasa azufre sustituida para lograr que el grupo sulfhidrilo esencial pudiese ser alquilado (De Toma y Westley, 1970), justificándose así la baja reactividad de la rodenasa cristalina con reactivos sulfhidrúlicos típicos, ya que la enzima cristalina, como usualmente se la aísla, está en gran parte constituida por la forma azufre sustituida.

Se han encontrado otras dos clases de reactivos inhibidores e inactivadores. Estos son aniones en general, por lo común en altas concentraciones (Sakai, 1960; Mintel y Westley, 1966 b), y compuestos aromáticos (Davidson y Westley, 1965; Wang y Volini, 1968). Ambas clases de reactivos actúan simplemente como inhibidores reversibles, estrictamente competitivos con el sustrato tiosulfato. Sin embargo, iones inferiores en la serie de Hofmeister (por ejemplo, los haluros) tienden a afectar la velocidad de saturación con tiosulfato y pueden también actuar en parte induciendo cambios irreversibles en la enzima. Los efectos de los aniones competitivos se interpretaron en base a consideraciones de fuerza iónica, particularmente teniendo en cuenta los efectos obtenidos al cambiar la constante dieléctrica del medio de ensayo (Mintel y Westley, 1966 b). Agregando metanol al solvente de reacción, aumentó considerablemente la velocidad de reacción a concentraciones subsaturantes de tiosulfato. Tomados conjuntamente, estos datos indican que el sitio activo de la rodenasa debe contener un centro catiónico al que se une el sustrato aniónico para formar el complejo enzima-tiosulfato. Posteriormente, un análisis más profundo de esta clase de datos demostró que podía llegarse a una mejor interpretación cuantitativa del fenómeno en base a consideraciones de pares iónicos, en lugar de utilizar la teoría de la fuerza iónica (Volini y

Wang, comunicación personal efectuada a Westley y reportada por dicho autor en 1973) aunque se alcanza el mismo resultado qualitativo, un sitio activo catiónico, por ambas rutas.

La existencia de un grupo triptofano en el sitio activo fue confirmada por los trabajos de Davidson y Westley (1965). Estos autores determinaron que varios compuestos aromáticos inhibían competitivamente a la rodenasa con respecto al tiosulfato. El ion piridilpiridinio fue el primero probado (Davidson y Westley, 1965); dicho ion forma complejos de transferencia de carga con los residuos triptofilo. Estos datos y el hecho de que la destrucción de un solo residuo triptofilo en la rodenasa con N-bromosuccinimida también inactivaba la enzima, sugirió que el triptofano está involucrado en el sitio activo, posiblemente como el subsitio de unión del azufre sulfano. La unión de un átomo de azufre a la rodenasa extingue la fluorescencia de la enzima libre (Davidson y Westley, 1965) originada por su grupo triptofano. Sin embargo, no hay diferencia entre los espectros ultravioleta de la enzima libre y azufre sustituida, a longitudes de onda por debajo de 300 nm y Finazzi Agró y col (1972) concluyeron que la extinción de la fluorescencia, probablemente no se debía a un mecanismo de contacto íntimo, postulando que el triptofano del sitio activo no se une a los átomos de azufre sulfano y que su función es contribuir a mantener una región fuertemente apolar en dicho sitio.

Estas conclusiones son también avaladas por los trabajos de Horowitz y Westley (1970) quienes reportaron los siguientes hallazgos: a) los aniones aromáticos son inhibidores competitivos mucho más fuertes que los alifáticos y b) el uso de acetato mercúrico fluorescente, como un "grupo marcador" unido al grupo sulfhidrilo esencial, mostraba la naturaleza completamente apolar de la región del sitio activo.

Finazzi Agró y col (1972) determinaron también que la banda de absorción en el U.V. cercano en el complejo rodenasa-azufre, era causada por la formación de un grupo persulfuro, R-S-SH. Por lo tanto el solapamiento de tal banda de absorción con la fluorescencia del triptofano podría producir la extinción observada en rodenasa.

Debido a la similitud que existe entre el azufre y el selenio se intentó determinar si la enzima podía unir selenio utilizando un donador apropiado, tal como selenosulfato. Cannella y col (1975 a) hallaron que la rodenasa en la forma libre reac-

ciona con el selenosulfato formando un complejo enzima-selenio, que es estable en solución a pH's mayores que 8. La adición estequiométrica de selenosulfato a la solución de rodenasa reduce su fluorescencia alrededor del 60%. El mecanismo de extinción de la fluorescencia debería ser el mismo para el selenio y para el azufre, ya que en ambos casos la unión de estos elementos a la enzima produce una nueva banda de absorción en el ultravioleta cercano, que compete con la emisión del triptofano. Este solapamiento es la condición esencial para la transferencia de energía no-radioactiva, desde los triptofanos al cromóforo formado en presencia de azufre o selenio. En este trabajo Cannella y col (1975 a) demostraron que la unión del selenio se efectuaba sobre un grupo cistina.

Estudios posteriores (Cannella y col, 1975 b) comprobaron que el 5-fosfato de piridoxal y otros aldehídos aromáticos inactivan la rodenasa. Esta inactivación alcanza mayor extensión si la enzima está en la forma libre de azufre. El residuo reactivo se identificó como un grupo amino por determinación espectrofotométrica del derivado 5'piridoxal fosforilado de la enzima. La inactivación aumentaba con la concentración de fosfato de piridoxal y podía ser parcialmente revertida por el agregado de tiosulfato o valina. Ambos compuestos podrían desestabilizar la unión del P-piridoxal al sitio activo. La diálisis prolongada contra buffer fosfato también producía reactivación de la enzima, confirmando la reversibilidad de la inactivación. El espectro de absorción del complejo fosfato de piridoxal-rodenasa presentaba un pico a 410 nm relativo a una base de Schiff y un hombro en la región de 330 nm debido probablemente a la reacción entre el fosfato de piridoxal y los grupos amino y tiol de la enzima que se encuentran muy cercanos. La enzima completamente inactiva contenía 4 residuos  $\epsilon$ -piridoxil-lisina por mol indicando que esos 4 grupos lisina son esenciales para la actividad de rodenasa (Cannella y col, 1975 b).

Todos estos estudios efectuados con ayuda de diversos agentes inhibidores e inactivadores, permiten postular la existencia de tres componentes esenciales en el sitio activo de la rodenasa:

- a) un grupo sulfhidrilo
- b) un grupo catiónico
- c) una región hidrofóbica



Todos estos componentes deben estar próximos desde el punto de vista espacial ya que la reacción con uno de ellos modifica la acción de los demás.

#### V.4. PROPIEDADES PROTEICAS

##### V.4.1. Estructura primaria

Sörbo (1953 a) empleando la enzima pura cristalizada, demostró que la rodenasa presentaba un espectro de absorción en el ultravioleta, característico para proteínas, con el correspondiente máximo de absorbancia a 280 nm (Sörbo, 1953 b).

No se hallaron evidencias sobre la existencia de algún grupo prostético. Cuando se descubrió la actividad sustrato aceptor del lipoato (Villarejo y Westley, 1963 a y b), se trató infructuosamente de encontrar lipoato en los hidrolizados ácidos de rodenasa (Villarejo y Westley, 1963 b).

Sörbo (1963, a) determinó la composición de aminoácidos de la rodenasa de hígado bovino. Reportó un peso molecular de 37.000, cuatro grupos sulfhidrilos y ningún puente disulfuro (Sörbo, 1963 a y b). De acuerdo al trabajo de Sörbo, la enzima con este peso molecular contenía 8 histidinas, 7 isoleucinas y 5 metioninas. Trabajos posteriores demostraron que la rodenasa de PM 37.000 correspondía a un dímero, probablemente de subunidades idénticas (Volini y col, 1967) y la cantidad de los aminoácidos mencionados podía ser 10, 6 y 4 respectivamente, coincidente con lo hallado por Davidson y Westley (resultados no publicados).

Varios autores encontraron diferencias con respecto a la cantidad de triptofano presente por molécula de enzima. Sörbo (1963 a) halló 11 residuos triptofano, determinados espectro fotométricamente, para un PM de 37.000, mientras que Davidson y Westley (1965) obtuvieron un valor de 8 por ambos métodos: espectrofotométrico (Benzce y Schmid, 1957) y químico (Spies y Chambers, 1949). Finazzi Agró y col (1972) en sus estudios obtuvieron por el método de Edelhoich (1967) 9 residuos. Para los otros aminoácidos, los únicos valores que se publicaron corresponden a la suma de los residuos lisina y arginina (37,5 del informe de Sörbo y 36 del análisis de Davidson). Esta suma fue

coincidente con la hallada por Volini y col (1967). Estos autores efectuaron un mapeo peptídico de rodenasa pura y separaron 18-20 péptidos trípticos, indicando que el peso molecular monomérico era la mitad de 37.000 (Volini y col, 1967).

De Toma y Westley (1970) estudiaron la composición de aminoácidos de cuatro péptidos trípticos de la rodenasa y hallaron que el péptido conteniendo el grupo sulfhidrilo del sitio activo y los tres péptidos que contenían los triptofanos eran fuertemente hidrofóbicos.

En un trabajo más reciente, Weng y col (1978 a) mediante la combinación de técnicas de filtración en gel y electroforesis de alto voltaje en papel, aislaron 19 péptidos trípticos obtenidos por ruptura en 18 residuos arginilo. Los péptidos trípticos fueron producidos a partir de la S-carboximetilcisteinil-rodenasa de hígado bovino cuyos grupos amino fueron bloqueados reversiblemente por reacción con anhídrido citracónico. La secuencia parcial o completa de estos fragmentos fue determinada utilizando la degradación de Edman. En algunos casos los análisis se completaron por degradación de los péptidos derivados con tripsina, quimotripsina o la proteasa de *Staphylococcus aureus*. La información así obtenida permitió el alineamiento de siete de los fragmentos trípticos y se determinó la secuencia de los primeros 79 residuos de la cadena polipeptídica. El fragmento tríptico 19 contenía además del residuo cisteinilo esencial para la catálisis, uno de los restos metionina. Dicho residuo cisteinilo, involucrado en la función catalítica de la rodenasa, estaba ubicado en la posición 247 (Russel y col, 1978). Los mismos autores comprobaron que la enzima era un polipéptido simple constituido por 293 restos de aminoácidos. En algunas preparaciones de la enzima faltaba el dipéptido NH<sub>2</sub>-terminal Val-His y la secuencia comenzaba con glutamina en la posición 3. La rodenasa así obtenida contiene 291 aminoácidos y posee completa actividad enzimática (Russell y col, 1978).

Estudios realizados por Weng y col (1978 b) modificando químicamente la enzima de hígado bovino, permitieron establecer importantes diferencias entre la rodenasa libre y el intermedio catalítico en el cual el átomo sulfano del donador de azufre está unido a la enzima covalentemente (rodenasa-S-sustituída). El tratamiento de la enzima libre con cantidades estequiométricas de iodoacetato o fenilgloxal producía una rápida modifica-

ción del grupo sulfhidrilo esencial de la Cys-247 y la consiguiente inactivación de la enzima. Del análisis de los datos de velocidad para la reacción del iodoacetato se obtuvo un pK aparente para este grupo de 7,8 con la enzima libre y de 6,7-7,0 para los complejos de la enzima con sustratos análogos donores de azufre. La inactivación de la rodenasa libre por fenilgloxal en presencia de  $\text{CN}^-$  era causada por las uniones disulfuro formadas entre la Cys-247 y la Cys-254 o Cys-263.

En contraposición a estos resultados obtenidos con la rodenasa libre, la enzima azufre sustituida no era inactivada por iodoacetato y sólo era lentamente afectada por tratamiento con grandes excesos de fenilgloxal. La pérdida de la actividad enzimática en la rodenasa-S-sustituida no involucraba los residuos cisteinilos pero podría relacionarse con la modificación de los grupos guanidinio principalmente el de la Arg-186, cuyas cadenas laterales podrían jugar un rol importante en la unión del sustrato.

La enzima por lo tanto existe en dos formas: una conteniendo azufre, en la cual dicho átomo está unido a la cisteína 247 como grupo persulfuro (E-S-SH), y la otra en forma libre (E-SH) donde el azufre transferible ha sido removido por aceptores nucleofílicos (Davidson y Westley, 1965; Finazzi Agró y col, 1972). Se han usado muchos reactivos específicos para determinar las propiedades de estas dos formas y el rol de los grupos -SH en la reacción catalítica. En particular se ha estudiado la reacción de la rodenasa con el ácido 5-5'ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB) tanto con la enzima azufre sustituida como con la forma libre (Pensa y col, 1977). El agregado de DTNB a la rodenasa libre de azufre produce un disulfuro mixto entre el grupo sulfhidrilo esencial de la enzima y el tionitrobenzoato, que puede ser atacado por ambos sustratos, cianuro y tiosulfato, restaurando la actividad catalítica.

El análisis de la estructura del derivado obtenido por tratamiento de la enzima con DTNB muestra que durante la reacción con este reactivo ocurre la formación oxidativa de un puente disulfuro entre dos grupos sulfhidrilos de la rodenasa (Figura V.2.).

La cianólisis de la enzima modificada produce un tiociano derivado de la enzima, del cual se libera tiocianato a partir de una  $\beta$ -eliminación parcial. El clivaje de las uniones disulfu

ro presentes en el aducto enzima-tionitrobenzoato usando cianuro marcado, sufre una incorporación de radioactividad mayor que la prevista.

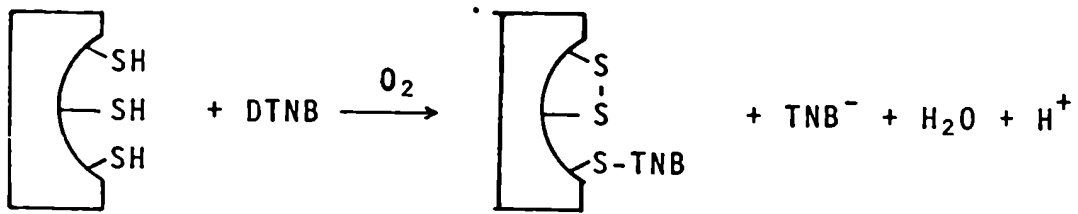


FIGURA V.2.: Reacción de rodenasa con DTNB.  
DTNB = 5-5' ditio-bis(2-nitrobenzoico)

Pensa y col (1980) postularon que ocurre una unión electrostática entre el cianuro y los grupos de la enzima cargados positivamente.

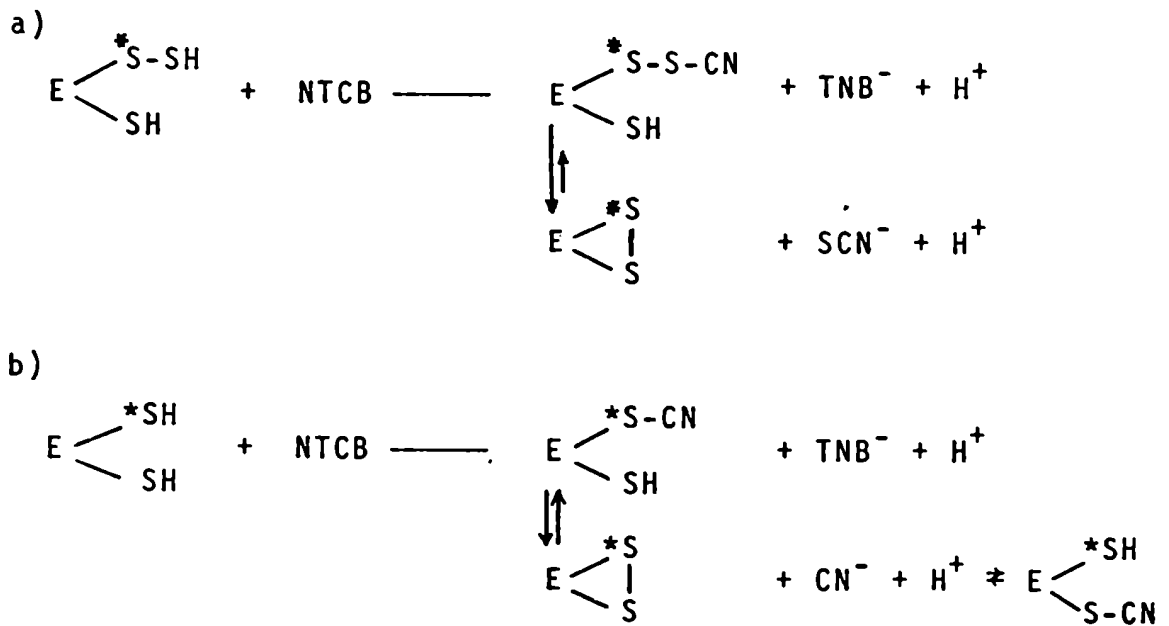
Los mismos autores comprobaron que se obtenían diferentes S-ciano derivados si la enzima azufre sustituida o la enzima libre se trataban con ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico (NTCB) (Pecci y col, 1980). La interacción con los grupos sulfhidrilos vecinos libera tiocianato del derivado rodenasa-azufre y cianuro del derivado rodenasa libre de azufre. En ambos casos se forma una unión disulfuro (Figura V.3.).

#### V.4.2. Estructura secundaria y terciaria

Drenth y Smith (1971) iniciaron estudios de cristalografía empleando rayos X, en cristales de rodenasa y en un derivado obtenido por agitación de los cristales de la enzima en una solución de p-cloromercuribenzoato. Comprobaron así la existencia de una molécula dimérica por unidad asimétrica y la unión de un átomo pesado por monómero en el correspondiente derivado.

Volini y Wang (1971, 1972) investigaron los cambios estructurales provocados por modificaciones en el ciclo catalítico utilizando técnicas de dispersión por rotación óptica y dicroísmo circular. Los resultados confirmaron que se producía una transición conformacional de cierta magnitud cuando el tiosulfato, sustrato donador de azufre, formaba un complejo con la rodenasa. Por comparación de los espectros de las dos formas en

zimáticas se concluyó que unos 20 aminoácidos estaban involucrados en un cambio, en el cual una estructura desordenada de tipo espiral pasaba a una ordenada tipo  $\beta$ , cuando la enzima unía el ión tiosulfato y descargaba el ión sulfito. La incapacidad del ión sulfato para producir un cambio conformacional sugirió que además del sitio catiónico, debía existir otro grupo enzimático comprometido en la unión del sustrato (Volini y Wang, 1973 a).



**FIGURA V.3.:** a) Cianolización de la rodenasa azufre sustituida  
 b) Cianolización de la rodenasa libre de azufre  
 El azufre marcado es el responsable de la actividad enzimática. NTCB: ácido 2-nitro-5-tiocianobenzoico;  $\text{TNB}^-$ : tionitrobenzoato

En 1974, Smith y col encontraron diferencias en la conformación de la cadena principal de las dos "subunidades" del presunto dímero.

Finalmente, Russell y col (1978) pudieron determinar la secuencia completa de aminoácidos de la rodenasa comprobando que está constituida por una única cadena polipeptídica de 293 residuos a la cual corresponde un PM de 32.900. Estos autores postularon que la rodenasa está formada por dos "domains" globulares de tamaño y conformación casi idénticos conectados por un segmento que comprende los residuos 143 a 158. La localización de este loop conectante, rico en prolina, en la superficie de la molécula podría hacerla especialmente susceptible a la pro-

teólisis y originar los pseudodímeros aislados y reportados previamente por varios autores (Volini y col, 1967, 1978).

El sitio activo de la enzima está localizado en una de presión entre los dos "domains" y la Cys-247 esencial para la catálisis se encuentra ubicada en el fondo de esta cavidad (Ploegman, 1977).

Por estudios cristalográficos efectuados sobre la rodenasa-S-sustituída se confirmó que la Cys-247 es el sitio al cual se une en forma covalente el azufre del sustrato donador (Ploegman y col, 1979). También pudieron explicarse en este tra bajo las predicciones anteriores sobre la importancia de las re giones hidrofóbicas y catiónicas en el sitio activo (Intel y Westley, 1966 b; Horowitz y Westley, 1970). Se determinó (Russell y col, 1978) que las cadenas laterales del Trp-35, Phe-106 y Tyr-107 del "domain" (I) y Phe-212 y Val-251 de la segunda mitad de la molécula (II) contribuyen a formar la pared hidrofóbica del sitio activo. Sin embargo todas las contribuciones hidrofílicas y la Cys-247 misma, derivan de la estructura COOH-terminal. Existe además, una asimetría funcional entre ambos "domains" a pesar de su semejanza estructural. Aunque la secuencia homóloga entre residuos equivalentes podría interpretarse como una evidencia de que los dos "domains" de la rodenasa están relacionados evolutivamente, sus semejanzas estructurales están mejor expresadas en sus modelos conformacionales que en sus estructuras primarias. Los modelos de estructuras secundarias predichos para cada "domain" de acuerdo a las reglas de Chou y Fasman (1974) corresponden perfectamente con las conformaciones determinadas experimentalmente (Ploegman y col, 1978 b).

Debido a que las semejanzas entre los "domains" son tan importantes, parece poco probable que sus equivalencias conformacionales sean casuales. La similitud estructural entre los dos "domains" está en agudo contraste con sus equivalencias funcionales; ésto es válido si consideramos a la rodenasa como una sulfotransferasa y aceptamos que ambos "domains" contribuyen al único sitio activo de esta actividad catalítica de la enzima.

Si las cadenas NH<sub>2</sub>-terminal y COOH-terminal se produjeron por duplicación genética y divergencia, es difícil comprender la presión selectiva que llevó a la conservación de modelos plegados análogos a pesar de los considerables cambios en la estructura covalente.

Podría pensarse que la cadena  $\text{NH}_2$ -terminal tuvo tiempo atrás un sitio activo y que posteriormente se alteró por pérdida de una cisteína. En este caso, la similitud estructural que presenta con el "domain II" podría ser sólo un reflejo de su función ancestral. También podría ser que estos hallazgos justifiquen una función de la rodenasa no conocida hasta el presente (Russell y col, 1978).

Recientemente Cannella y col (1981) separaron, por electroforesis en gel de poliacrilamida preparativa en disco, cuatro formas moleculares de la enzima cristalina de hígado bovino llamadas rodenasa I, II, III y IV, basándose en sus diferentes movilidades electroforéticas anódicas. Todos estos componentes tenían el mismo peso molecular de alrededor de 35.000 y también poseían la misma composición de aminoácidos. Las formas aisladas de la enzima eran estables y no se interconvertían en un proceso tiempo-dependiente, si se conservaban en solución o al estado cristalino. Estos resultados demostraban que las cuatro formas tenían la misma estructura covalente sugiriendo que se trataba de isómeros conformacionales.

Esta hipótesis fue apoyada por los espectros de dicroísmo circular en la región U.V. cercano de los cuatro componentes en la forma conteniendo azufre, es decir S-enzima, ya que el cambio conformacional que implica la unión del S a la rodenasa e involucra el grupo o grupos triptofanilos, ocurre durante la catálisis mediante ciclos enzimáticos en los cuales se pasa de la forma S-sustituída a la forma S-libre (Cannella y col, 1980). Las diferencias observadas en los espectros de dicroísmo circular indicarían una modificación en la estructura terciaria del sitio activo (Cannella y col, 1981). Los estudios cristalográficos revelaron que el azufre unido a la enzima se encuentra como grupo persulfuro y es estabilizado por las uniones hidrógeno de los grupos peptídicos vecinos (Ploegman y col, 1978 a). Así, las diferentes conformaciones del sitio activo deberían influir sobre la estabilidad del grupo persulfuro. Incluso la cantidad de azufre transferible unido a las cuatro formas, determinado por la absorbancia a 276 nm y 335 nm o a partir del contenido de azufre cianolizable era diferente variando desde un valor de 0,97 a 0,74 mol S/mol de enzima en la forma IV y en la forma I respectivamente. A pesar de este hallazgo las formas presentaban actividades específicas similares excepto la forma I cuyo valor

era un 40% menor (Cannella y col, 1981). Evidentemente las diferencias en la estructura terciaria de estos isómeros conformacionales no afectaba significativamente sus capacidades de transferir azufre. Esta interpretación está de acuerdo con los datos reportados previamente (Wang y Volini, 1973; Volini y Wang, 1973 a) indicando la flexibilidad de la molécula de rodenasa con respecto a la unión del azufre.

Considerando que en los extractos mitocondriales de hígado se encontró esencialmente la forma IV de la enzima, el componente de mayor actividad y más alto contenido de azufre persulfuro, se sugirió que los otros isómeros conformacionales pueden originarse a partir de la forma IV durante el proceso de purificación; apoyando esta hipótesis Blumenthal y Heinrikson en 1971, habían reportado que las proporciones de las diferentes formas de rodenasa dependían del procedimiento preparativo empleado. Más aún, Cannella y col (1981) encontraron que dichas proporciones variaban de preparación a preparación incluso empleando el mismo procedimiento.

#### V.4.3. Estructura cuaternaria

El peso molecular de la rodenasa de hígado bovino determinado por Sörbo (1953 b), usando métodos de velocidad de sedimentación, fue de 37.500. En un trabajo posterior, Westley y Green (1959) reportaron el mismo coeficiente de sedimentación para las enzimas de hígado y riñón bovinos. Sin embargo, Volini y col en 1967, realizaron estudios de filtración en gel y sedimentación y postularon que la forma de PM 37.500 estaba en rápido equilibrio dependiente del pH con especies cuyo PM era la mitad, permitiendo a la enzima convertirse por autooxidación a una forma estable de PM 37.500. El mapeo peptídico de la enzima corroboraba un PM de 19.000 para el monómero, sugiriendo que probablemente ambas subunidades fuesen idénticas.

Horowitz y Westley (1970), usando técnicas de polarización fluorescente, confirmaron el equilibrio monómero-dímero. La disociación del monómero se favorecía cuando la constante dieléctrica del medio bajaba, introduciendo detergentes o elevando el pH a 10. La rodenasa previamente oxidada a un dímero estable no mostraba ninguno de estos efectos.



Ellis y Woodward (1975) re-investigaron la disociación propuesta por Horowitz y Westley (1970) empleando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. Cuando la rodenasa de hígado bovino altamente purificada se trató con agentes denaturalizantes y reductores de uniones disulfuro, se encontró un único peso molecular para la enzima de 35.000. De estos datos surgían dos posibilidades: a) la enzima poseía, en realidad, una única cadena polipeptídica, o b) se trataba de un homodímero unido covalentemente. La primera posibilidad se descartó ya que los mapas de los péptidos trípticos de la rodenasa en dos estudios independientes (Volini y col, 1967; Blumenthal y Henrikson, 1971) revelaron secuencias redundantes. Otros trabajos también interpretaron la secuencia de ciertos péptidos en términos de una tiosulfato sulfotransferasa dimérica (Blumenthal y Henrikson, 1972 a y b).

En base a estos conceptos se llevaron a cabo experiencias para determinar si la enzima era un dímero unido por uniones disulfuro (Ellis y Woodward, 1975). La enzima fue sometida a un tratamiento que incluía reducción y carboximetilación en guanidina-ClH 8 M a 37 °C y diálisis contra SDS 2% y mercaptoetanol 5%. Sin embargo, el peso molecular determinado por electroforesis en dodecilsulfato de sodio era el mismo. También se la sometió a un clivaje por acción del bromuro de cianógeno en solución de ácido fórmico al 70% y se obtuvieron productos intermedios de PM mayor que el supuesto para el presunto monómero de 18.500. Estos datos son consistentes con la proposición que la tiosulfato sulfotransferasa es un monómero de peso molecular aproximadamente 35.000 con cuatro residuos metionina por molécula.

También para la enzima de *Acinetobacter calcoaceticus* se halló un peso molecular de 35.000 y no se observó degradación de la misma en subunidades más pequeñas cuando se la sometió al tratamiento con 2-mercaptoetanol (Vandenbergh y Berk, 1980).

Asimismo, recientemente se determinó un peso molecular de 33.000 para la enzima de hojas, pulpa y cáscara de mandioca (Anosike y Ugochukwu, 1981), dato que coincide con el valor de 32.000 previamente reportado para la enzima de repollo (Tomati y col, 1972).

Con respecto al contenido de iones metálicos de la enzima, Volini y col (1967) encontraron que la rodenasa de hígado bo

vino cristalina contiene un ion Zn por monómero de PM 18.500. Bryant y Rajender (1971) usando técnicas de resonancia magnética nuclear, confirmaron la existencia de un sitio de unión para el ion Zn en el monómero de la rodenasa y encontraron además que la enzima nativa puede prepararse libre de Zn. Asimismo demostraron que la inhibición enzimática por dicho ion aparentemente se debería a la disminución en la concentración del sustrato por formación de un complejo entre el cianuro y el  $Zn^{2+}$  agregado.

Desafortunadamente, aún no se ha establecido la importancia de la capacidad de unión del ion metálico para la actividad enzimática. El problema surge de la dificultad para eliminar las últimas trazas de cationes divalentes no solamente del material de vidrio y buffers sino también de los sustratos utilizados. La cantidad de iones metálicos necesarios para activar la enzima es muy pequeña y todos los sustratos de la rodenasa excepto los tiosulfatos son agentes complejantes de estos iones. Cualquier catión complejado al ion sustrato donador o al ion sustrato aceptor presumiblemente llegaría fácilmente al sitio activo. En base a estos datos, ha sido muy difícil verificar o eliminar la posible participación de los iones metálicos divalentes en la actividad de rodenasa.

#### V.5. MECANISMO DE ACCION

A partir de los estudios de Sörbo (1962 a) se consideró a la rodenasa como una enzima muy útil para realizar estudios de mecanismo. Debido a la simplicidad estructural de sus sustratos y productos y al bajo peso molecular de la enzima misma se especuló que el mecanismo de reacción catalizado por la rodenasa debía ser muy sencillo.

##### V.5.1. Mecanismo cinético

El primer mecanismo formal fue propuesto por Sörbo (1951 b). Dicho mecanismo planteaba la existencia de una unión disulfuro en el sitio activo, e involucraba el clivaje de la misma por acción del tiosulfato, con formación de un sulfenil-tiosulfato. Esta especie era atacada por el cianuro, eliminando

sulfito y formando un tiocianato orgánico, el cual posteriormente era descompuesto para regenerar el disulfuro por eliminación de sulfocianuro (Figura V.4.). Tal secuencia se ajusta formalmente a un mecanismo irreversible de Theorell-Chance.

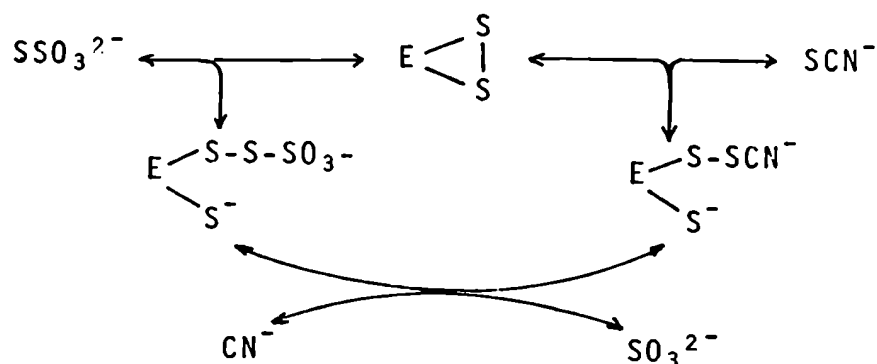


FIGURA V.4.: Mecanismo de Theorell-Chance propuesto por Sörbo (1951 b)

A posteriori Sörbo (1964) reconoció dos fallas químicas en su teoría: a) no pudo demostrar la aparición del grupo sulfhidrilo, cuando la rodenasa era tratada con tiosulfato en ausencia de cianuro, y b) los típicos sulfenil-tiosulfatos propuestos no eran cianolizados con eliminación de sulfito.

Szczepkowski (1961) refutó el mecanismo de Sörbo después de ensayar la cianólisis de sulfenil-tiosulfatos y obtener tiosulfato y un tiocianato orgánico en lugar de los productos postulados en el mecanismo. Además aunque Szczepkowski mantuvo la idea de la unión disulfuro en el sitio activo, propuso un mecanismo alternativo con un intermediario enzimático trisulfuro (Figura V.5.).

Este es un mecanismo de doble desplazamiento.

En 1962 (b), Sörbo comprobó que la rodenasa no contenía uniones disulfuro y ambos mecanismos fueron descartados pero la propuesta de doble desplazamiento fue establecida por demostración directa de un intermediario enzimático azufre-sustituído y sus reacciones con los iones tiofílicos apropiados.

Green y Westley (1961) observaron que la rodenasa como usualmente se la aísla es en realidad la forma azufre-sustituída. Por métodos polarográficos se determinó que la reacción de la enzima cristalina con cantidades estequiométricas (aproximada

damente 2 equivalentes por PM 37.000) de sulfito o cianuro rendía tiosulfato o sulfocianuro respectivamente.

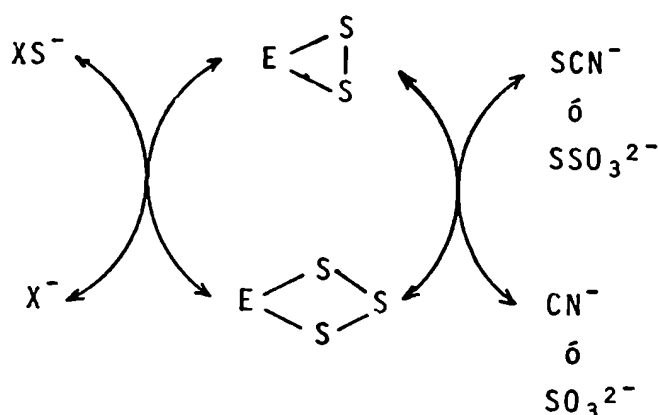


FIGURA V.5.: Mecanismo propuesto por Szczepkowski (1961).  
XS<sup>-</sup>: donador sulfano

En base a estos experimentos, el mecanismo propuesto fue la típica forma de doble desplazamiento (Figura V.6.).

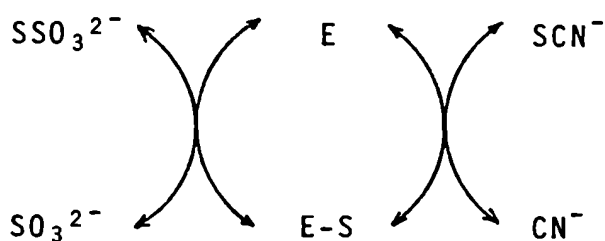


FIGURA V.6.: Mecanismo de doble desplazamiento

Este mecanismo fue confirmado por las experiencias de Westley y Nakamoto (1962), quienes comprobaron que la enzima tratada con <sup>35</sup>SSO<sub>3</sub><sup>2-</sup> quedaba marcada con <sup>35</sup>S en cantidades equivalentes mientras que no se hallaba marcación si la rodenasa se trataba con S<sup>35</sup>SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Por tratamiento con CN<sup>-</sup> o SO<sub>3</sub><sup>2-</sup> a 0 °C, el <sup>35</sup>S era removido muy rápidamente de la enzima marcada aislada, obteniéndose <sup>35</sup>SCN<sup>-</sup> o <sup>35</sup>SSO<sub>3</sub><sup>2-</sup> respectivamente. El azufre radiactivo podía también ser removido por denaturalización térmi-

mica de la enzima, liberándose en este caso como azufre elemental. En trabajos posteriores basados en la actividad de tiosulfato reductasa de rodenasa, se demostró también que ese intermediario azufre-enzima reaccionaba estequiométricamente con dihidrolipoato para producir sulfuro y lipoato oxidado (Villarejo y Westley, 1963 b).

Los resultados citados hasta aquí permitieron establecer la formación de una rodenasa azufre-sustituída capaz de reaccionar rápidamente en sistemas que constituyen un ciclo catalítico. En todos estos casos, surgió la incógnita de como determinar en qué sentido se producía el flujo principal de la reacción catalizada por la rodenasa. La respuesta se obtuvo del análisis de una cinética con dos sustratos. Volini y Westley (1966) la aplicaron estudiando la reducción de tiosulfato por dihidrolipoato catalizada por rodenasa. Estos resultados confirmaron que operaba un mecanismo formal típico de doble desplazamiento con inhibición competitiva mutua por ambos sustratos. Westley y Heyse (1971) realizaron un análisis similar para las reacciones entre tiosulfato y cianuro, y tiosulfonato y cianuro catalizadas por rodenasa; estos autores obtuvieron resultados que coincidían rigurosamente con un mecanismo formal de doble desplazamiento incluso a concentraciones extremadamente altas de ambos sustratos (Westley, 1972).

Luego de establecer inequívocamente la existencia del mecanismo por doble desplazamiento, quedó por dilucidar la ocurrencia y localización de los intermediarios transitorios significativos cinéticamente dentro del mencionado ciclo catalítico.

Mintel y Westley (1966 a) hallaron que la velocidad máxima de la reacción catalizada por la enzima era mucho mayor con tiosulfonatos que con tiosulfato como sustrato donador de azufre. Por lo tanto, la rodenasa debería formar un complejo cinéticamente significativo con tiosulfato y postularon el mecanismo descrito en la Figura V.7.

Posteriormente, Volini y Westley (1966) comprobaron que la rodenasa azufre-sustituída forma un complejo cinéticamente significativo cuando se usa lipoato como sustrato aceptor (Figura V.8.).

La aparición del intermediario lipoato persulfuro ya había sido demostrado anteriormente (Villarejo y Westley, 1963 b)

y confirmado también por Silver y Kelly (1976) en trabajos posteriores empleando rodenasa purificada a partir de cultivos de *Thiobacillus*.

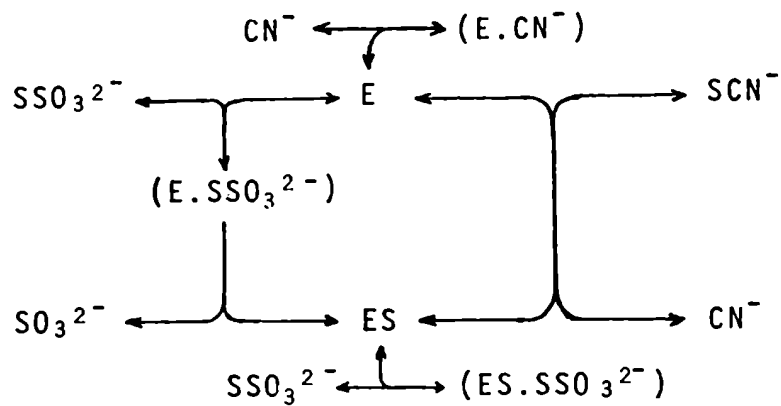


FIGURA V.7.: Mecanismo propuesto por Mintel y Westley (1966 a). Formación del complejo rodenasa-tiosulfato.

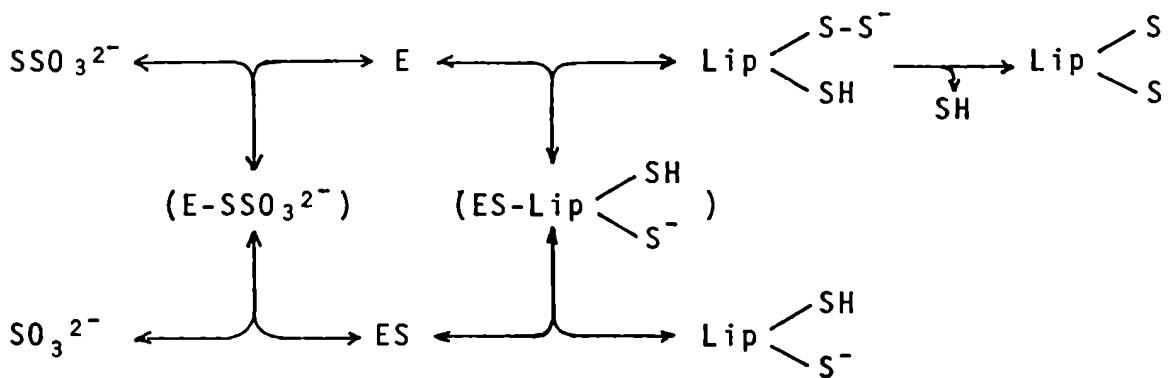


FIGURA V.8.: Mecanismo propuesto por Volini y Westley (1966). Formación del complejo enzima-lipoato.

Westley y Heyse (1971) realizaron estudios con dos sustratos utilizando tiosulfatos como donores y cianuro como aceptor; obtuvieron por extrapolación de sus datos valores de velocidad máxima infinita cuando las concentraciones de ambos sustratos se aumentaban en forma ilimitada. Estos resultados permitieron proponer un mecanismo sin complejos cinéticos significativos para esta combinación de sustratos (Figura V.9.).

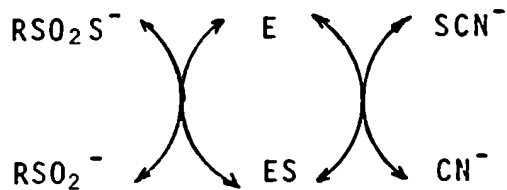


FIGURA V.9.: Mecanismo cinético propuesto para rodenasa sin formación de complejos intermedios.

Probablemente sin embargo, un estudio más preciso con concentraciones de los sustratos suficientemente altas demostraría la saturabilidad de la enzima por estos sustratos, e indicaría la formación de por lo menos un complejo cinéticamente significativo.

Mintel y Westley (1966 a) hallaron evidencias que justificaban que la inhibición por sustrato ocurría por formación de complejos dead-end con  $\text{SSO}_3^{2-}$ ,  $\text{CN}^-$ , dihidrolipoato y algunos tiosulfonatos. Estos investigadores, a partir de datos cinéticos obtenidos para los tiosulfonatos aromáticos, detectaron la formación de complejos no-productivos por "unión incorrecta o equivocada" de los sustratos.

Westley y Heyse (1971) también demostraron bajo ciertas condiciones experimentales, inhibición por sustrato.

Estudios efectuados sobre la estructura de la rodenasa habían permitido concluir que el sitio activo de la enzima era de naturaleza catiónica (Mintel y Westley, 1966 b) y así el complejo inicial formado entre la rodenasa y su sustrato aniónico es un par iónico. En estudios posteriores, Wang y Volini (1973) demostraron que la enzima libre también forma pares iónicos con sulfato, acetato, formiato y glicinato e igualmente con los iones producto sulfito y tiocianato. Estos autores basándose en sus resultados propusieron el mecanismo detallado en la Figura V.10. El intermediario azufre-enzima (ES) también forma pares iónicos con los aniones antes mencionados incluyendo el sustrato tiosulfato. Los pares iónicos formados con la enzima libre constituyen complejos dead-end. Sin embargo los pares ió-

nicos formados con ES, en particular aquellos con sulfato, acetato, formiato y glicinato, llegan a producto y al hacerlo, eliminan la inhibición observada con el ión tiosulfato. Por otro lado, el estudio de los parámetros termodinámicos indica que las interacciones enzima-anión tienen lugar en un contorno hidrofóbico en el cual la solvatación del ion es mínima.

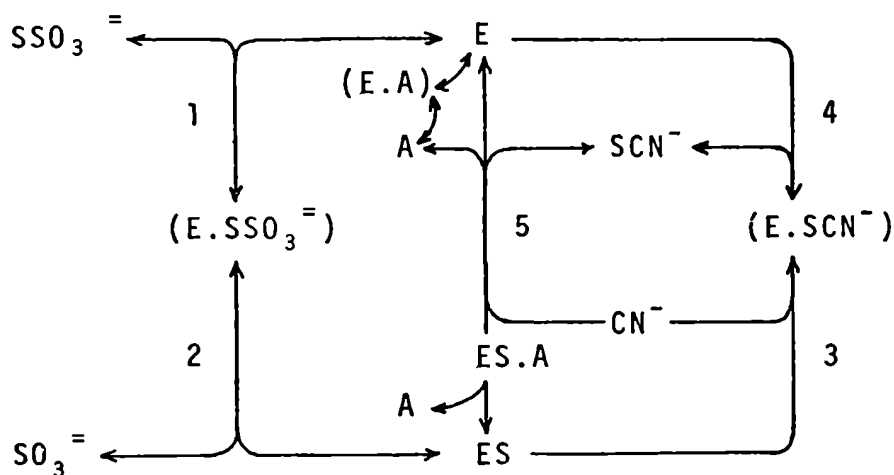


FIGURA V.10.: Mecanismo formal para la reacción de catálisis de rodenasa en presencia de aniones inhibitorios distintos del sustrato. Las reacciones 4 y 5 y la reacción total catalizada por la enzima son irreversibles.

Estos mecanismos cinéticos descritos representan un nivel de resolución mínimo. Es probable que existan otros intermedios además de los propuestos y que estudios adecuados permitan su detección. Por ejemplo, aunque se encontró (Schlesinger y Westley, 1972) que la reacción del ion cianuro con azufre-rodenasa para producir sulfocianuro y la enzima libre puede ser una simple reacción bimolecular de difusión controlada a valores de pH por debajo de 5,5, no hay razón para dudar que uno o más complejos intermedios pueden estar involucrados en esta reacción a valores de pH más altos y hay evidencias que confirman esta hipótesis (Intel y Westley, 1966 a; Volini y Wang, 1971, 1972).

El comportamiento cinético de la rodenasa de hígado bovino fue investigado a valores de pH entre 5,0 y 10,8 (Schlesinger y Westley, 1974). Se comprobó que el tiosulfato se



unía más fuertemente a la enzima protonada que a la forma desprotonada. Además la enzima libre y la forma azufre sustituida reaccionaban con numerosas especies aniónicas incluyendo sustratos que inhibían la reacción, proceso pH dependiente.

En base a los datos obtenidos se planteó la existencia de tres formas para la enzima azufre sustituida (ES) (Figura V.11) y se calcularon los pK de sus equilibrios en 5,9 y 9,4 (Schlesinger y Westley, 1974).

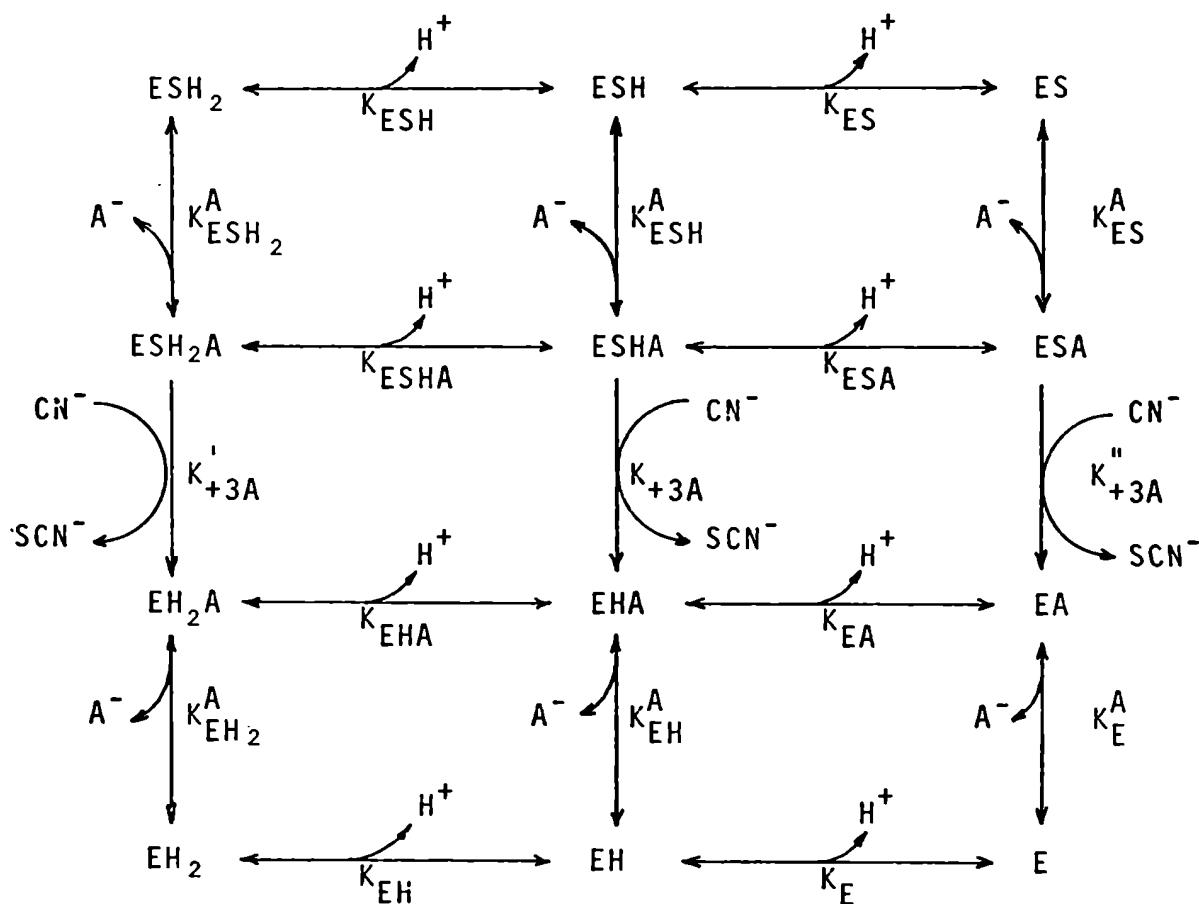


FIGURA V.11.: Mecanismo formal propuesto que incluye las tres formas del complejo enzima azufre sustituida-anión y las reacciones de estos complejos con el complejo enzima libre-anión más tiocianato.

También se determinaron las constantes de la reacción de segundo orden producida cuando la S-enzima reacciona con el ion cianuro, éstas son  $8,9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ;  $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  y  $\leq 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , pasando del estado más protonado (E-SH<sub>2</sub>) al menos protonado (ES). Además estos mismos autores estudiaron los parámetros de activación para la reacción de rodenasa con tiosulfato y cianuro a pH 8,7, hallando que la entalpía de la activa-

ción era muy pequeña mientras que la entropía de activación era mucho mayor y negativa indicando que probablemente existe un estado de transición entre la S-enzima y los productos y que dicho estado de transición involucra una considerable neutralización de cargas.

Jarabak y Westley (1974 c) trataron de determinar si distintos grupos de sustratos donores o aceptores actuaban en el mismo sitio activo de la rodenasa o en sitios diferentes y realizaron experimentos analizando la cinética en el estado estacionario cuando se empleaban sustratos mixtos. Utilizaron enzima purificada de hígado humano y bovino y comprobaron que la E-azufre sustituida difiere en su reactividad dependiendo de la naturaleza del sustrato donador de azufre. En otras palabras, parece que la enzima "recuerda" la estructura del sustrato del cual recibió el átomo de azufre transferible, durante un período significativo después que el primer producto ha sido liberado de la enzima. Este fenómeno se observó tanto para la rodenasa de hígado bovino como para la enzima de hígado humano y está probablemente relacionado con el importante cambio conformacional que ocurre en esta enzima durante la unión con el sustrato donador (Jarabak y Westley, 1974 b).

Estos mismos autores, Jarabak y Westley (1974 a) realizaron un estudio comparativo entre las enzimas de hígado humano y bovino. Hallaron diferencias en las actividades específicas, absorción ultravioleta y comportamiento cinético, sugiriendo que ambas proteínas no eran idénticas. Además sólo la enzima humana presentó activación por el sustrato aceptor cianuro. Estos resultados fueron explicados considerando la formación de un isómero de la enzima azufre sustituida (Figura V.12.).

Los datos obtenidos para la enzima bovina quedaban justificados en el esquema de la Figura V.13.

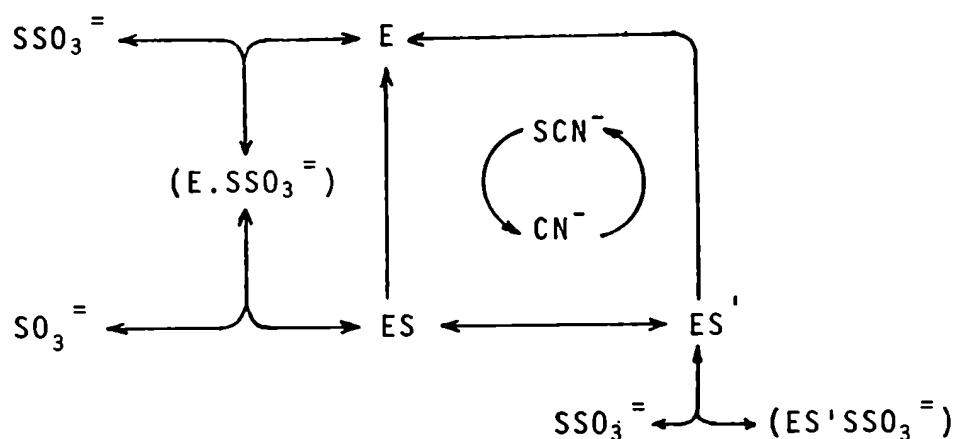


FIGURA V.12.: Mecanismo formal propuesto para la reacción  $\text{CN}^- + \text{SSO}_3^-$  catalizado por la rodanasa de hígado humano. (E) enzima; (ES) enzima S-sustituída; (ES') enzima S-sustituída isomerizada.

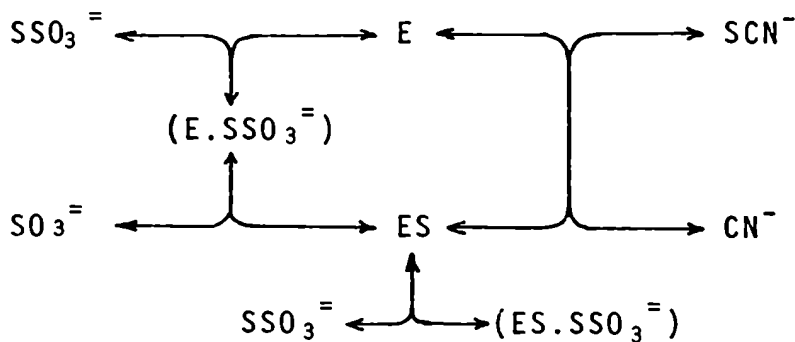
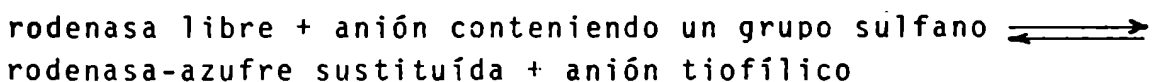


FIGURA V.13.: Mecanismo de acción de la rodanasa de hígado bovino

### V.5.2. Mecanismo químico

Considerando el mecanismo de doble desplazamiento, surgido de los numerosos estudios cinéticos efectuados, juntamente con la especificidad de la rodanasa por sus sustratos podemos representar la reacción catalizada por esta enzima mediante la siguiente ecuación:



En esta reacción el proceso químico para la formación de la enzima S-sustituída involucra la ruptura de una unión S-S. Los estudios para dilucidar el mecanismo químico de esta enzima, se han basado en los resultados logrados con sistemas químicos puros utilizados por Kice (1968, 1971) para investigar el clivaje de la unión disulfuro. Los ataques electrofílicos y nucleofílicos que se producen sobre la unión S-S del tiosulfato podrían resumirse en la Figura V.14.:

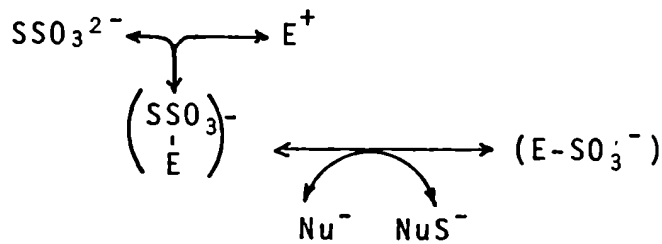


FIGURA V.14.: Mecanismo químico propuesto para la rodenasa basado en ataques electrofílicos y nucleofílicos.  
 $\text{E}^+$ : estructura electrofílica ;  $\text{Nu}^-$ : reactivo tiofílico.

Mintel y Westley (1966 a, b) reportaron estudios cinéticos de rodenasa empleando solventes de distinta composición y una variedad de tiosulfonatos como sustratos, considerados análogos del  $\text{SSO}_3^{2-}$ . Los resultados mostraron dos efectos: a) la presencia de sales neutras interferían con la unión del tiosulfato, y b) el reemplazo de un  $-\text{O}^-$  del tiosulfato por cualquier unidad orgánica relativamente electrofílica causaba un gran aumento (aproximadamente 100 veces) en la velocidad máxima alcanzada por la reacción catalizada por la enzima. Estos efectos se interpretaron en términos de la participación de un sitio catiónico para la unión del tiosulfato y un sitio electrofílico, probablemente el mismo grupo, como catalizador en la reacción de ruptura de la unión azufre-azufre. Esta etapa es el paso limitante de la velocidad máxima en este ciclo catalítico, con tiosulfato como donador de azufre. La participación del sitio electrofílico, se explica por los efectos inductivos que produce sobre la unión disulfuro.

Leininger y Westley (1968) reportaron un estudio más de tallado de la reacción entre tiosulfato y cianuro catalizada por rodenasa, en términos de los parámetros termodinámicos aparentes para la unión del tiosulfato y la ruptura de la unión azufre-azufre. Los resultados de este trabajo sugieren que en el clivaje de la unión azufre-azufre, además de la catálisis electrofílica, se requiere un fuerte nucleófilo enzimático.

Se observó un cambio de entropía muy grande en el paso de unión del tiosulfato, superior al que puede atribuirse a efectos electrostáticos y otros efectos conocidos, sugiriendo un cambio conformacional de la enzima en este paso. El mecanismo propuesto entonces, involucra grupos electrofílicos y tiofílicos existentes en la estructura de la enzima según puede verse en la Figura V.15.

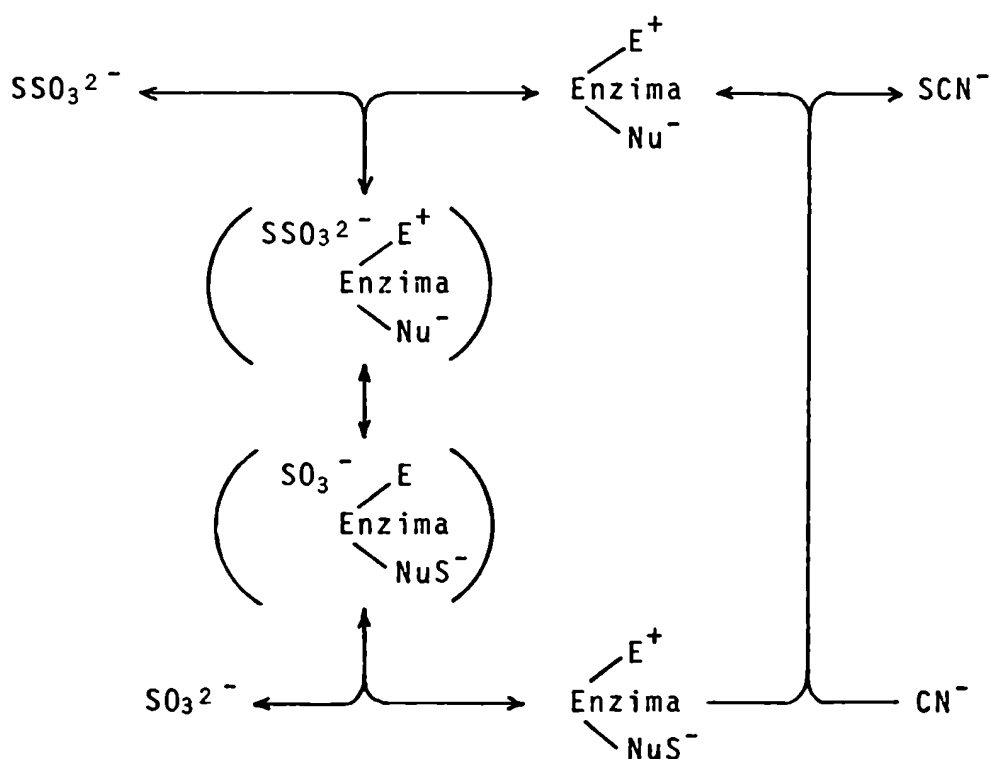


FIGURA V.15.: Mecanismo químico propuesto para la rodenasa, donde los grupos electrofílicos y tiofílicos forman parte de la enzima.

Volini y Wang (1973 a, b) y Wang y Volini (1973) comprobaron, a partir de estudios cinéticos y espectrales combinados, que al unirse el tiosulfato y liberarse el ion sulfito la proteína sufre una transición de una forma tipo espiral desordenada

a una estructura tipo  $\beta$  ; estando involucrados en esta etapa 20 residuos de aminoácidos. La proteína, en el intermediario azufre-sustituído está en una forma contraída y se relaja a la forma enzima libre por liberación de tiocianato vía la transición recíproca desde  $\beta$  a espiral, interviniendo los mismos residuos aminoácidos. En la Figura V.16. se representa esquemáticamente el mecanismo propuesto por los autores, el cual está de acuerdo con los resultados obtenidos.

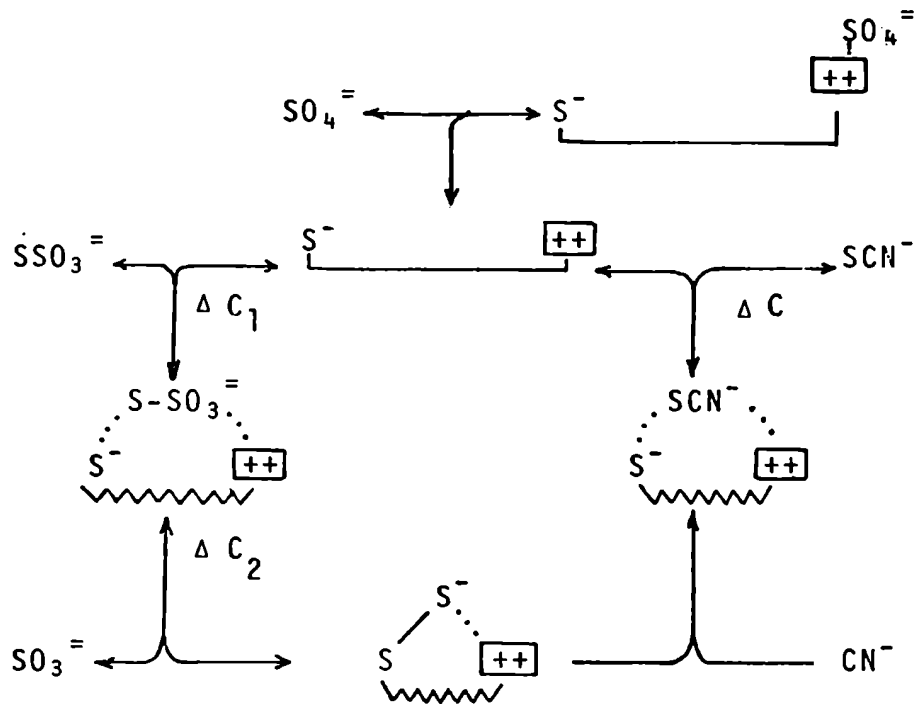


FIGURA V.16.: Mecanismo propuesto para la catálisis de rodenasa.

$\Delta c$ : cambio conformacional

Los datos termodinámicos y espectrales relacionados al ion sulfato indican que la neutralización de carga no es condición suficiente para producir el cambio conformacional y, consecuentemente, implica que el azufre transferible del tiosulfato está involucrado en la unión del sustrato. Mintel y Westley (1966 b) demostraron que el grupo sulfhidrilo enzimático, era esencial para la actividad, y lo propusieron como el sitio de unión para el azufre transferible. La unión del tiosulfato lleva al grupo sulfhidrilo y al sitio catiónico (Mintel y Westley, 1966 b; Volini y Wang, 1973 a ) a una mayor proximidad en el complejo, resultando de ello un cambio conformacional (Figura V.16.,  $\Delta c_1$ ). La ruptura del complejo y la descarga del ion sulfito produce una cercanía aún mayor de estos grupos en el in

intermediario azufre-sustituído, con el concomitante cambio conformacional (Figura V.16.,  $\Delta c_2$ ). La ocurrencia de estos cambios está justificada por datos termodinámicos (Wang y Volini, 1973).

El intermediario azufre-enzima se representa aquí como un derivado persulfuro estabilizado por asociación con el sitio catiónico. Finazzi Agró y col (1972) comprobaron que la enzima presenta una banda de absorción cerca de 330 nm, característica de uniones persulfuro; sin embargo, el coeficiente de extinción es muy bajo comparado con el de los derivados persulfuro en sistemas modelo (Villarejo y Westley, 1963 b). La asociación producida con el grupo catiónico podría explicar la disminución en la intensidad de absorción observada. Este mecanismo (Wang y Volini, 1973) justifica también que la velocidad máxima de la reacción sea independiente de los cambios de fuerza iónica. El paso limitante de la velocidad está constituido por la suma de dos procesos en los cuales ocurren cambios de carga de igual magnitud pero de signo opuesto; por ejemplo la unión azufre-azufre entre el tiosulfato y la enzima genera una carga neta de -1 y la liberación del ion sulfito produce una carga neta de + 1. La evidencia termodinámica indica también una relajación mayor de la proteína por liberación del ion tiocianato.

El cambio conformacional  $\Delta c_1$ , sirve para distorsionar la unión azufre-azufre en el complejo enzima-tiosulfato favoreciendo el clivaje de la unión y reforzando el efecto de desplazamiento electrónico producido por el sitio catiónico. El cambio  $\Delta c_2$ , sirve para estabilizar el intermediario persulfuro altamente reactivo permitiéndole unirse al sitio catiónico.

Incluso, los mismos autores comprobaron que los cambios conformacionales de la proteína se producen por unión de ésta con otros aniones que no actúan como sustratos sino que son inhibidores, originando estructuras inertes (Volini y Wang, 1973 b).

A pesar de los numerosos estudios realizados aún queda por dilucidar la identidad de los grupos electrofílicos y nucleofílicos activos de la rodenasa. Si se acepta que un ion metálico funcional está presente en la enzima, sería obviamente el punto clave para atribuirle el rol combinado de sitio catiónico y electrófilo. Varios autores (Volini y col, 1967; Bryant y Rajender, 1971; Volini y Wang, 1973 a y b) han demostrado que la rodenasa es capaz de unir al  $Zn^{2+}$  fuertemente y en base a estos

datos, Schlesinger y Westley (1974) han postulado que este ion sería el responsable del sitio catiónico divalente. Si por el contrario, se demuestra que un ion metálico no está involucrado, las cadenas laterales de arginina y lisina deberían considerarse con mayor interés. Incluso un grupo catiónico univalente podría ser un poderoso catalizador en un sitio activo hidrofóbico. Hasta el presente, la identidad del grupo electrofílico es una incógnita.

El nucleófilo enzimático es probablemente el grupo sulfhidrilo esencial (Wang y Volini, 1968). Sörbo (1962 b) fue el primero en sugerir que la rodenasa azufre-sustituída podría ser un persulfuro. Hylin y Wood (1959) encontraron que los tioles serían catalizadores de esta reacción con la formación de intermediarios persulfuro .

Westley y Heyse (1971) estudiaron a los tioles como catalizadores para la reacción tiosulfato-cianuro, hallando evidencias espectrales de la formación de intermediarios persulfuro. Dichas evidencias parecen confirmar muchos de los principales hallazgos químicos de la catálisis de rodenasa. Un tiosulfonato switteriónico sirve como donador de azufre sólo si es netamente aniónico a cualquier pH; esto apoya el requerimiento para una interacción electrostática entre el sustrato donador de azufre y el sitio activo de la enzima. Además la participación del grupo sulfhidrilo enzimático esencial como nucleófilo está ampliamente confirmada por el éxito de los tioles simples para actuar como catalizadores de la misma reacción.

#### V.6. FUNCIONES BIOLÓGICAS

Las funciones biológicas de la rodenasa no pueden plantearse mediante una única reacción química. Si bien esta enzima se descubrió debido a su efecto detoxificante del cianuro en mamíferos existen actualmente evidencias que postulan que ésta no es la única función; o incluso que no es su función más importante. Se han propuesto otros roles; en particular en determinadas especies bacterianas en las cuales el metabolismo del azufre es sumamente importante.

Veamos cuáles son y cómo se interpretan actualmente dichas funciones.



### V.6.1. Detoxificación de cianuro y sulfuro inorgánico

Como ya se mencionó, cuando en 1933 Lang (a y b) detectó actividad de rodenasa en mamíferos, propuso que su función principal sería la detoxificación del cianuro.

Posteriormente, Sörbo (1957 a) demostró que la citocromo oxidasa de mamíferos inhibida con cianuro o sulfuros, podía reactivarse por tratamiento con rodenasa y tiosulfato. Sin embargo, los elevados niveles de esta enzima presentes en hígado humano (Westley, 1973) no justificarían la función primaria asignada a esta enzima.

Por otra parte, es importante recordar que uno de los principales problemas en salud humana a escala mundial, está relacionado con el predominio de glucósidos cianogénicos en tejidos de plantas usados para la alimentación. Millones de personas utilizan la mandioca como su principal fuente de calorías, ésta contiene cantidades considerables de materiales cianogénicos. Como consecuencia de ello poblaciones enteras padecen una intoxicación crónica provocada por el cianuro proveniente de esta fuente. El resultado es neuropatía atáxica, e indirectamente bocio y varias otras enfermedades (Westley, 1980). La etiología de estas enfermedades es compleja, y a pesar de que pueden estar implicadas varias interacciones nutricionales, se acepta que el compromiso primario es causado por la toxicidad del cianuro (Wilson, 1973). Incluso en áreas donde la población no es tan dependiente de alimentos que contienen glucósidos cianogénicos, la importancia de los mecanismos de detoxificación del cianuro se hacen evidentes en los casos en los que se presenta la enfermedad hereditaria conocida como atrofia óptica de Leber. Los pacientes que padecen esta enfermedad son extremadamente sensibles a las trazas de cianuro encontradas en el humo del tabaco, sidra, etc. Estos pacientes exhiben una difusa neuropatología semejante a la presentada por las poblaciones que consumen mandioca y además sufren una ceguera repentina y permanente luego de la primera exposición al cianuro aún en cantidades más bien pequeñas, como la incorporada al organismo cuando dichos pacientes comienzan a fumar (Wilson, 1965). Evidentemente, el resto de las personas poseen un mecanismo eficiente de detoxificación de cianuro.

Otra intoxicación muy conocida es la producida por el

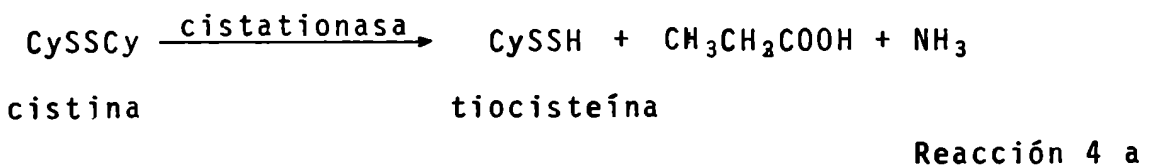
sulfuro inorgánico que es prácticamente tan tóxico para los mamíferos como el cianuro. El sulfuro es muy abundante ya sea considerando las fuentes minerales o las biológicas. Las intoxicaciones causadas por la forma mineral, como sulfuros metálicos, son poco probables. Sin embargo, existe una cifra anual establecida de víctimas producidas por contacto industrial con el gas sulfuro de hidrógeno (Burnett y col, 1977); el aporte de  $H_2S$  a la atmósfera por procesos microbiológicos es del orden de  $10^8$  toneladas de azufre anuales en el mundo (Kellogg y col, 1972). Además, incluso los tejidos mamíferos contienen enzimas que producen persulfuros, los que pueden liberar  $H_2S$  espontáneamente. A pesar de ello, por algún mecanismo, los mamíferos no sufren intoxicación por el sulfuro inorgánico producido endógenamente. Por otra parte los humanos, generalmente, se sobreponen a la intoxicación originada por exposición accidental a  $H_2S$ , lo que indica que deben existir también mecanismos efectivos para detoxificar el sulfuro inorgánico.

#### V.6.1.1. Interpretación convencional

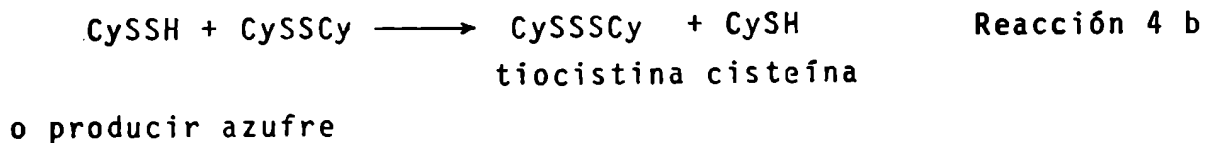
Las consideraciones anteriores nos llevan a anticipar la existencia de procesos de detoxificación para el cianuro y el sulfuro inorgánico. Ambos venenos ejercen sus efectos bioquímicos primarios por inhibición reversible de la citocromo oxidasa, debido a la alta afinidad que poseen por los iones metálicos presentes en este transportador final de electrones. Podría esperarse, por lo tanto, que sus mecanismos de detoxificación tuviesen mucho en común. Esta suposición se confirma por el hecho de que los tratamientos de emergencia para las intoxicaciones por cianuro y sulfuro inorgánico son similares: alejar al paciente de la atmósfera tóxica, mantener la respiración, y permitir una detoxificación fisiológica normal, ayudada algunas veces por administración de nitritos (Thiens y Haley, 1964) o aminofenoles (Cristel y col, 1977), los cuales permiten que el cianuro o sulfuro sea almacenado temporariamente como ciano o sulfometahemoglobina. En el caso de la intoxicación por cianuro, la administración de tiosulfato o sales de cobalto también favorece la recuperación (Frankenberg y Sörbo (1975); pero no se ha desarrollado una terapia equivalente para el caso de intoxicación por sulfuro.

Durante muchos años se aceptó que en los animales el cianuro era detoxificado por conversión a tiocianato a través de una reacción catalizada por rodenasa (Lang, 1933 a). El tiosulfato, sustrato donador de azufre de la rodenasa, es relativamente abundante fisiológicamente (Giast y col, 1952) y la administración de tiosulfato o tiosulfonatos, resultó un tratamiento efectivo para esta intoxicación (Sörbo, 1972).

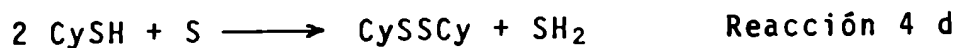
Koj y Frendo (1962) y Szczepkowsky y Wood (1967) propusieron que la rodenasa estaría involucrada también en la protección contra el envenenamiento por sulfuro producido endógenamente por acción de la cistationasa sobre cistina y compuestos análogos según se detalla en las Reacciones 4 a,b,c,d,e y f.



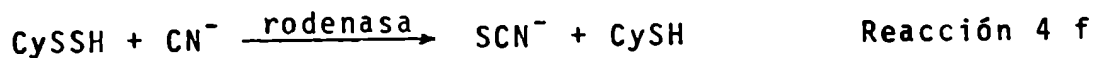
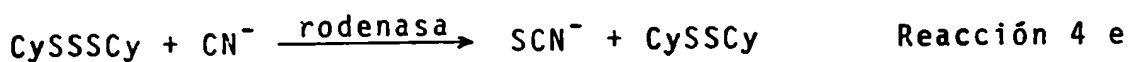
La tiocisteína puede reaccionar con cistina produciendo tiocistina:



para finalmente liberar SH<sub>2</sub>



La rodenasa acoplada a la cistationasa y en presencia de un sustrato aceptor evitaría la liberación de sulfuro de hidrógeno.



#### V.6.1.2. Interpretación modificada. El pool de azufre sulfano

Varias observaciones sugieren que la interpretación anterior del proceso fisiológico normal, para la detoxificación de cianuro y sulfuro inorgánico, es inadecuada.

Fundamentalmente los efectos agudos, y los efectos tóxicos producidos por exposición aguda o crónica a ambos agente, ejercen su acción primaria sobre el sistema nervioso central, principalmente sobre el centro de control de la respiración. Sin embargo, el contenido de rodenasa del sistema nervioso central, y del tejido nervioso en general, no guarda relación con el contenido del tejido hepático y renal. Además, en una intoxicación aguda, puede presentarse una falla directa circulatoria, sin embargo el contenido de rodenasa en músculo cardíaco es pobre. Teóricamente se debería esperar que el agente protector, estuviera concentrado en el órgano u órganos más sensibles al tóxico (Westley, 1980).

Observaciones posteriores (Sörbo, 1975), sugirieron que la rodenasa no estaría involucrada en este proceso de detoxificación de una manera directa ya que solamente una muy pequeña parte de la actividad enzimática se utilizaría para la detoxificación del cianuro administrado *in vivo*. La gran discrepancia hallada por Sörbo (1975) entre sus experimentos *in vivo* e *in vitro* mostraron una ineficiencia inusual de los mecanismos directos desarrollados en respuesta a un requerimiento de detoxificación.

Estas diferencias podrían justificarse en parte considerando que la incorporación natural de cianuro, para la cual se desarrolló teóricamente el mecanismo de detoxificación, se produce principalmente a través de los alimentos. En esta situación, la localización hepática de la mayor actividad de rodenasa tiene sentido teleológico y la eficiencia de la detoxificación estaría vinculada con la entrada primaria del tóxico en la circulación portal (Westley, 1973) en cuyo caso, el hígado tendría oportunidad de eliminar el tóxico de la sangre impidiendo que llegue a otros tejidos.

Sin embargo, el mismo razonamiento no sería aplicable a la detoxificación de sulfuro inorgánico, cuyas vías de incorporación al organismo serían la endógena o la respiratoria.

Otra observación del sistema de detoxificación del cianuro que no puede dejarse de lado, está relacionada con los pacientes con atrofia óptica hereditaria. Examinando muestras de biopsias de hígado o de autopsias de dichos pacientes, se encontró un contenido de rodensasa completamente normal (Wilson, 1965) y, a pesar de ello, estos individuos no podían detoxificar cianuro convirtiéndolo en tiocianato. Se postuló entonces que la falla primaria no estaba a nivel de rodensasa sino en un pool de azufre en el estado de oxidación correcto para efectuar dicha conversión (Wilson, 1965).

Esta teoría se generalizó postulándose que en individuos normales existe un pool fisiológico de azufre en el nivel de oxidación apropiado para reaccionar con el cianuro (Westley, 1973). A pesar de las otras funciones de los componentes de este pool, ellos están siempre disponibles para reaccionar con el cianuro cuando es necesario. En realidad se demostró la existencia de tal pool de azufre sulfano por medio de experimentos con marcación en ratas, comprobando que dicho pool es muy reactivo con el cianuro (Schneider y Westley, 1969). Además de utilizarse para la detoxificación de cianuro, puede usarse también en la síntesis de cisteína. Puede, asimismo, ser la fuente del azufre inorgánico requerido para la síntesis de ferro-sulfoproteínas, tales como la ferredoxina. Por lo tanto el análisis de la detoxificación del cianuro *in vivo* debe plantearse actualmente considerando el pool de azufre sulfano, su composición, los compuestos relacionados, incluyendo los sulfuros inorgánicos.

Para ello es importante analizar la síntesis y utilización de los componentes del pool mencionado.

Todas las estructuras que contiene átomos de azufre sulfano se sintetizan naturalmente en los sistemas biológicos. Sus átomos sulfanos son rápidamente intercambiables *in vivo*, si inyectamos a mamíferos derivados conteniendo  $^{35}\text{S}$ -sulfano se observa una rápida aparición de radioactividad en tiosulfato, politionatos y proteínas asociadas a azufre. Esta experiencia apoya firmemente la teoría del pool de azufre sulfano.

Veamos a continuación las reacciones involucradas en la síntesis y utilización de S-sulfano.

#### V.6.1.21 Reacciones catalizadas por enzimas que usan o producen azufre sulfano

Hay cuatro enzimas que están involucradas en la formación, interconversión y utilización de azufre sulfano: tiosulfato sulfotransferasa o rodenasa, mercaptopiruvato sulfotransferasa, tiosulfato reductasa y  $\gamma$ -cistationasa.

Las dos primeras son capaces de utilizar cianuro como sustrato aceptor de azufre; las cuatro enzimas pueden producir persulfuro que espontáneamente pasa a sulfuro inorgánico a menos que se acople a otros sistemas que lo transforme en compuestos no tóxicos (Westley, 1977).

#### V.6.1.211 Utilización de azufre sulfano

Se conocen dos enzimas que utilizan azufre a partir del pool sulfano: rodenasa y tiosulfato reductasa. Ambas transfieren átomos sulfanos. Ellas difieren en la especificidad por el sustrato aceptor, la distribución biológica y mecanismo.

##### V.6.1.211.1. Rodenasa (Tiosulfato sulfotransferasa)

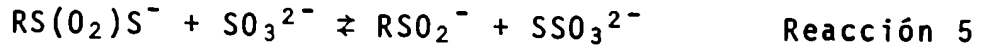
Analicemos bajo este nuevo enfoque las reacciones en las cuales participa esta enzima.

##### . La reacción con cianuro

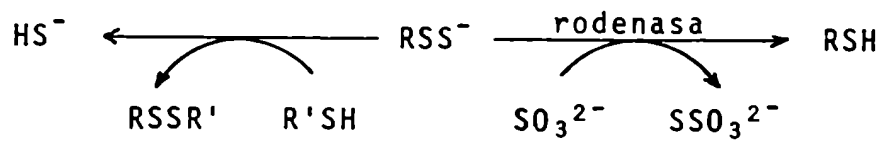
Como ya se ha mencionado, muchos farmacólogos y toxicólogos aceptan que la reacción entre tiosulfato y cianuro catalizada por rodenasa, es el principal mecanismo para la detoxificación de cianuro y que esta función constituye el rol primario de la enzima. Sin embargo, existen razones que invalidan esta hipótesis. Una de ellas surge de considerar que la rodenasa está ubicada en la matriz mitocondrial (Sörbo, 1951 a y b; DeDuve y col, 1955; Koj y col, 1975), mientras que el tiosulfato como tal presenta una lenta e incompleta penetración a través de la membrana interna de la mitocondria (Greville y Chapell, 1959).

. La reacción con sulfito

Usando un sustrato donador de azufre sulfano, por ejemplo un tiosulfonato de la forma  $RS(O_2)S^-$ , se observa que el sulfito puede servir como sustrato aceptor de azufre alternativo al cianuro (Sörbo, 1957 a) (Reacción 5).



Además la utilización por rodenasa del sulfito como sustrato aceptor con persulfuros como sustratos donores evita la formación de compuestos tóxicos (Reacción 6).



Reacción 6

Considerando que los persulfuros pueden ser producidos por varias enzimas y que el tiosulfato es no tóxico (Sörbo, 1972), esta reacción se ha propuesto como la base para la detoxificación endógena de sulfuro (Koj y Frenedo, 1962; Szczepkowski y Wood, 1967).

. Interconversión de formas de azufre sulfano

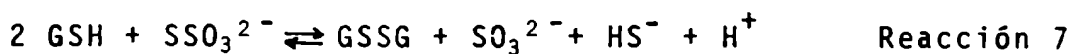
Considerando todas las investigaciones efectuadas hasta el presente podría postularse que el rol primario de la rodenasa es la interconversión de distintas formas de azufre-sulfano. Por ejemplo: persulfuro  $\rightarrow$  tiosulfato; persulfuro  $\rightarrow$  polisulfuro.

Para poder evaluar la importancia de esta función, será necesario primero conocer las múltiples funciones del pool de azufre sulfano.

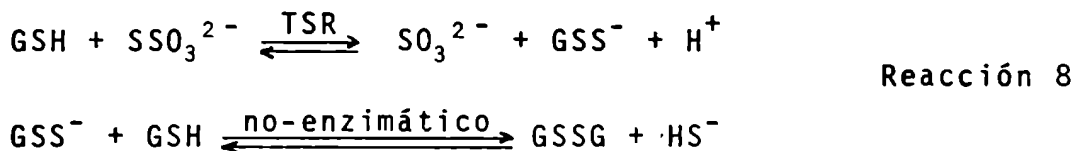
V.6.1.211.2. Tiosulfato reductasa (TSR)

. Reacción

Estudios realizados por Kaji y McElroy (1959) determinaron que la tiosulfato reductasa cataliza la siguiente reacción: (Reacción 7)



Uhteg y Westley (1979) sugirieron que posiblemente la enzima funcione como una simple transferasa, produciéndose luego una reacción no-enzimática de uno de los productos con el exceso de tiol (Reacción 8).



Planteada así, la reacción catalizada por esta enzima resulta muy similar a la catalizada por rodenasa. La diferencia fundamental es la especificidad por el sustrato aceptor: para la rodenasa el cianuro es mejor aceptor que cualquier tiol; para la tiosulfato-reductasa, los tioles GSH y cisteína, son los únicos sustratos aceptores conocidos y el cianuro no es utilizado por esta enzima (Uhteg y Westley, 1979).

Todavía no se conoce con exactitud el rol fisiológico de la tiosulfato reductasa.

La reacción que cataliza esta enzima podría ser útil en la síntesis de ferro-sulfoproteínas, en las cuales el azufre se halla al estado sulfuro.

Alternativamente, la reacción inversa, análoga a la catalizada por rodenasa con persulfuro como donador y sulfito como aceptor, sería efectiva en la detoxificación de sulfuro. Probablemente ambos roles se cumplan parcialmente.

#### La enzima: distribución biológica, mecanismo y propiedades moleculares

En muchos procariotes, la actividad de tiosulfato reductasa requiere un sistema de hidrogenasa como donador de electrones. En contraste, la tiosulfato reductasa de tejidos mamíferos, y de levadura, utiliza tioles como sustratos donadores de electrones (aceptores de azufre). La distribución de la reductasa en tejidos mamíferos difiere de la de rodenasa. El hígado y el riñón tienen actividades de reductasa equivalentes; cerebro, corazón, intestino y testículos contienen un tercio o un cuarto de la actividad específica del hígado (Koj y col, 1977).



En cuanto a la distribución intracelular, a diferencia de la rodenasa, la tiosulfato reductasa no está restringida a la matriz mitocondrial, ya que también se detecta un 20% de su actividad en el citosol (Koj y col, 1975).

El mecanismo cinético es completamente diferente al de rodenasa. En lugar de una enzima azufre-sustituída en una reacción por doble desplazamiento, la reductasa funciona por un mecanismo secuencial random que requiere la presencia de ambos sustratos al mismo tiempo (Figura V.17.).

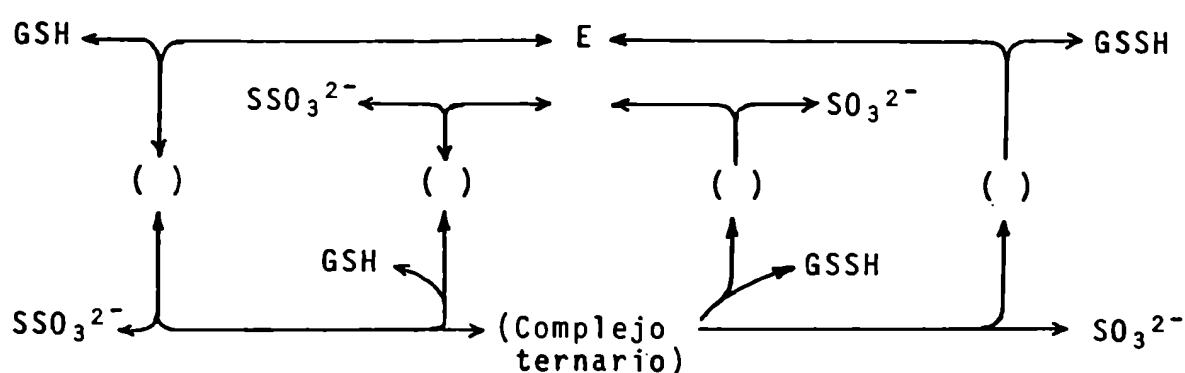


FIGURA V.17.: Mecanismo cinético de tiosulfato reductasa. Los paréntesis representan complejos de adición binarios.

La tiosulfato reductasa de levadura es una pequeña enzima de PM aproximadamente 17.000, que contiene una única cadena polipéptida (Uhteg y Westley, 1979).

#### V.6.1.212. Producción de azufre sulfano

La rodenasa y la tiosulfato reductasa pueden interconvertir las varias formas de azufre sulfano; además están involucradas en las reacciones de óxido-reducción de dichos compuestos pero no pueden producir "nuevas" moléculas que contengan azufre sulfano.

En tejidos animales existen 2 enzimas capaces de clivar las uniones carbono-azufre para dar nuevo azufre-sulfano: la 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa y la  $\gamma$ -cistationasa. Ambas enzimas producen persulfuros inestables y en consecuencia sulfuro.

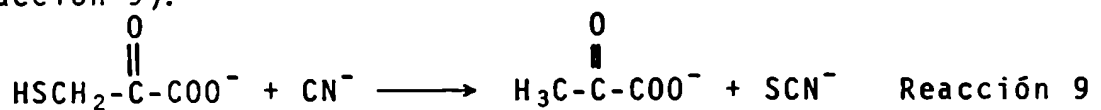
#### V.6.1.212.1. 3-Mercaptopiruvato sulfotransferasa

Se cree que el 3-mercaptopiruvato se produce biosintéticamente por transaminación de la cisteína (Meister y col, 1954). Sus principales rutas metabólicas incluyen: clivaje a piruvato, con transferencia del azufre como átomo sulfano a sulfito formando tiosulfato, o a tiol formando el correspondiente persulfuro, o a cianuro formando tiocianato. La enzima que cataliza las transferencias a estos aceptores es la 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa, pero el 3-mercaptopiruvato no es su único sustrato donador. Es evidente que esta enzima podría estar tan involucrada en el metabolismo del cianuro y del sulfuro como lo está la rodenasa. Además, puede participar en la tiolación de las bases pirimidínicas del tRNA, aunque todavía se discute si *in vivo* el 3-mercaptopiruvato o la cisteína actúan como donadores de azufre para este propósito (Wong y col, 1970; 1974; 1975; Harris y col, 1975 y Harris, 1978).

##### . La reacción con cianuro

El contenido de rodenasa y de 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa en hígado y riñón es aproximadamente equivalente; a pesar de ello a esta última enzima no se le atribuye un rol importante en la detoxificación del cianuro. Una razón es que el mercaptopiruvato ha sido un efectivo antídoto para la intoxicación por cianuro en algunos mamíferos pero no en otros (Clemenson y col, 1958).

Además, de estudios cinéticos minuciosos efectuados con la enzima altamente purificada, se ha comprobado que se forma menos tiocianato que piruvato desconociéndose hasta el momento las razones de esta desigualdad. (Jarabak y Westley, 1980) (Reacción 9).



##### . La reacción con tioles

La 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa utiliza a los tioles como sustratos aceptores, con formación de piruvato y el correspondiente persulfuro, actuando así como un potencial productor de sulfuros. La reacción inversa no ha podido ser demostrada.

. La reacción con sulfito

Cuando el sulfito (o un sulfinato) es el sustrato aceptor, se produce tiosulfato (Sörbo, 1957 b) (Reacción 10).



Reacción 10

donde R puede ser el grupo  $-\text{O}^-$  o un residuo orgánico. Se piensa que esta reacción con sulfito inorgánico como aceptor es la principal fuente fisiológica de tiosulfato.

Más aún, considerando la velocidad con que el sulfito es producido a partir de cisteína *in vivo* vía cisteína sulfinato, sulfinil piruvato, es muy probable que ésta sea la principal fuente "de novo" del azufre sulfano. Nuevamente el significado fisiológico de esta sulfotransferasa se apreciará mejor cuando se conozcan las funciones del pool de azufre sulfano.

. La enzima: distribución biológica, mecanismo y propiedades moleculares

La 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa está ampliamente distribuida filogenéticamente. Se la ha medido en tejidos animales, hongos y bacterias. Los niveles más altos de actividad específica se encontraron en hígado y riñón; corazón y otros tejidos poseen actividades menores (Koj y col, 1977). En eritrocitos se detectaron cantidades significativas de actividad enzimática (Van Den Hamer y col, 1967). En las células hepáticas, la mayor concentración de la enzima se halla en la matriz mitocondrial pero también existe un 20% en el citosol (Koj y col, 1975).

Los únicos estudios acerca del mecanismo de esta sulfotransferasa, se llevaron a cabo con la enzima aislada de riñón bovino. Si bien el mecanismo cinético depende de la naturaleza del sustrato aceptor de azufre usado, para todos ellos se ha propuesto que es de tipo secuencial (Figura V.18.) (Sörbo, 1957 b; Vachek y Wood, 1972; Jarabak y Westley, 1978 y 1980); es decir, se requiere la presencia de ambos sustratos sobre la superficie de la enzima antes de que cualquier producto sea

liberado; además, aparentemente no se necesita la formación de un intermediario enzima azufre-sustituída. Aunque el 3-mercaptopiruvato, siendo un tiol, puede actuar a su vez como sustrato aceptor, existen otros tioles tales como el mercaptoetanol que son aceptores más activos.

Todavía no se conocen detalles sobre el mecanismo químico, aunque Vachek y Wood (1972) han demostrado que el cobre no está involucrado.

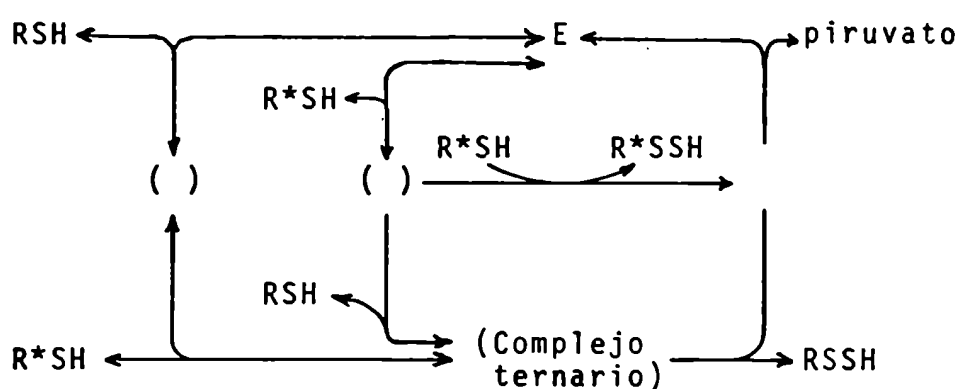


FIGURA V.18.: Mecanismo cinético propuesto para la 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa. Los paréntesis representan complejos de adición binarios.  
 $R^* = \text{-OOC-C(=O)-CH}_2\text{-}$   $R = \text{HOCH}_2\text{-CH}_2\text{-}$

En cuanto a las propiedades moleculares, la enzima de *E. coli* se comporta como una típica proteína globular con un peso molecular de aproximadamente 24.000 (Vachek y Wood, 1972). La enzima de riñón bovino tiene un peso molecular similar al de la rodenasa de hígado y riñón (aproximadamente 33.000), calculado en base a diagramas de elución de columnas de Sephadex G-100 (Jarabak y Westley, 1978).

#### V.6.1.212.2. $\gamma$ -Cistationasa (Cistationina $\gamma$ -liasa)

##### . Reacción con cistina para producir cisteína persulfuro

Como se mencionó anteriormente, la  $\gamma$ -cistationasa actúa clivando asimétricamente la cistina dando como productos de reacción cisteína persulfuro, piruvato y amonio (Reacción 11) (Cavallini y col, 1962; Flavin, 1962).



Análogamente a la 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa el clivaje de la unión carbono-azufre por  $\gamma$ -cistationasa produce un átomo de azufre sulfano. La diferencia radica en el sustrato donador, el cual es un tiol para la sulfotransferasa y un disulfuro para la cistationasa.

A pesar de la abundancia en que se encuentra esta enzima en los tejidos mamíferos, se duda sobre el significado fisiológico de la reacción que involucra a la cistina como sustrato, fundamentalmente porque en las células hay muy poca cistina libre para ser utilizada por la enzima. La principal función metabólica de esta enzima sería la transformación de homocisteína, producto remanente de las metilaciones por S-adenosil-L-metionina a cisteína y  $\alpha$ -cetobutirato. Sin embargo, como ya hemos visto, también se ha propuesto la existencia de un sistema acoplado cistationasa y rodenasa, que utiliza *in vitro* cistina y sulfito para producir tiosulfato, el cual explicaría la función de la rodenasa en la detoxificación del sulfuro endógeno (Szczepkowski y Wood, 1967).

• La enzima: distribución biológica, mecanismo y propiedades moleculares

La  $\gamma$ -cistationasa parece encontrarse solamente en eucariotes (Greenberg, 1975). Fue purificada a partir de *Neurospora* (Flavin y Segal, 1964) y de hígado de rata (Matsuo y Greenberg, 1958). También se la detectó en *Rp. spheroides* (Wider de Xifra y col, 1976).

En tejidos mamíferos la mayor actividad se halla en hígado y riñón, encontrándose muy bajos valores en los otros órganos (Greenberg, 1975).

Intracelularmente, la cistationasa parece estar ubicada en el citosol y esto dificultaría la acción del propuesto sistema acoplado con rodenasa, la cual está presente solamente en la matriz mitocondrial. Sin embargo, como se señaló antes, existen otros productores de persulfuro en la matriz.

El mecanismo de acción de la  $\gamma$ -cistationasa es completamente diferente al de las sulfotransferasas. La cistationasa

contiene un cofactor y su mecanismo de acción es un típico mecanismo fosfato de piridoxal dependiente (Figura V. 19.) (Greenberg, 1975).

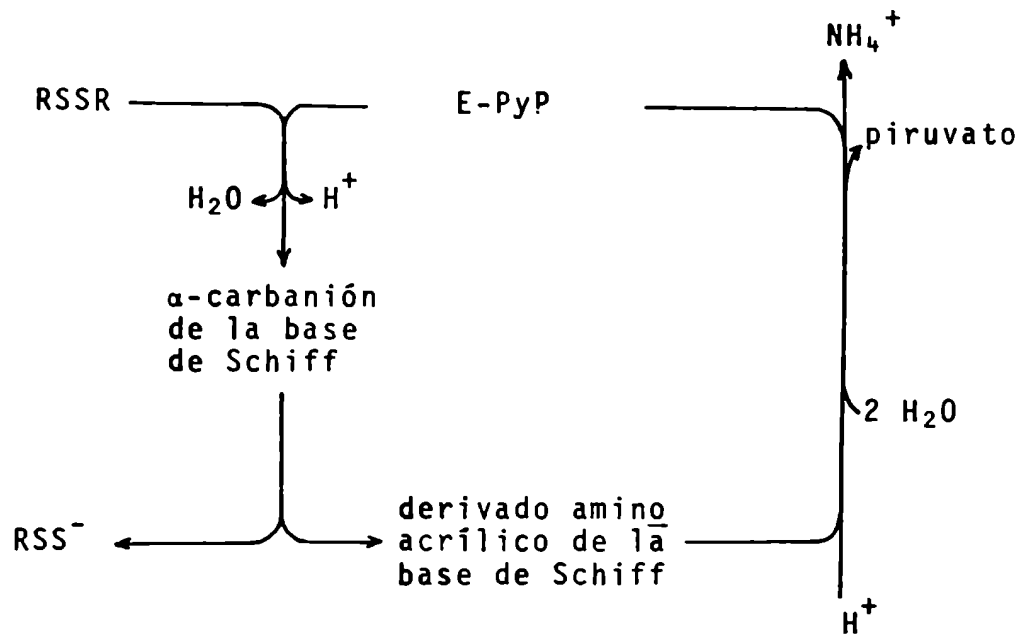


FIGURA V.19.: Mecanismo cinético de  $\gamma$ -cistationasa usando cistina como sustrato  
 $R = -CH_2-\underset{\substack{| \\ NH_3^+}}{CH}-COO^-$

La enzima de hígado de rata fue purificada hasta aparente homogeneidad. Tiene un peso molecular de 170.000 y cuatro moléculas de fosfato de piridoxal unidas (Matsuo y Greenberg, 1958).

#### V.6.1.213. Metabolismo de pesticidas y sulfanos

Es importante considerar otra fuente de azufre sulfano biológica, además de las ya mencionadas. Un gran número de estudios realizados a mediados y fines de la década del 70 demostraron que el azufre del disulfuro de carbono y de los pesticidas tiocarbonilos y fosforotionatos, es retenido en la forma azufre sulfano cuando estos compuestos son oxidados metabólicamente (DeMatteis, 1974; Catignani y Neal, 1975; Hunter y Neal, 1975; Seawrighty col, 1976; Kamataki y Neal, 1976; Neal y col, 1976; Järvisalo y col, 1978).

El sistema celular involucrado es el citocromo P-450 del retículo endoplasmático, el cual por desulfuración oxidativa de

esos compuestos produce azufre unido a proteínas; dicho azufre está unido probablemente como grupo persulfuro de los residuos cisteinilos de la proteína. Una de las proteínas afectadas por este proceso es la apoproteína del mismo citocromo P-450, con la consecuente disminución de la actividad de este sistema. No se sabe si este azufre sulfano proviene de la acción de las enzimas 3-mercaptopiruvato sulfotransferasa y  $\gamma$ -cistationasa. Tampoco se conoce si las enzimas capaces de utilizar el azufre sulfano (rodenasa y tiosulfato reductasa) favorecen la recuperación de la actividad del citocromo P-450 *in vivo*.

#### V.6.1.22. Toxicidad por agotamiento de azufre sulfano

Del análisis efectuado hasta aquí podemos concluir:

- 1) Existen procesos para la detoxificación biológica de cianuro y sulfuro.
- 2) Dichos procesos están directamente vinculados con las interacciones y niveles del pool de azufre sulfano, y no son simples detoxificaciones enzimáticas.

Esta posición sugiere que algunos de los efectos tóxicos vistos en la intoxicación crónica por cianuro, son posiblemente efectos secundarios causados por el agotamiento del pool de azufre sulfano debido a las reacciones en las cuales se forma tiocianato. Se puede suponer que tales efectos contribuyen a la complejidad de las interrelaciones nutricionales existentes en tales intoxicaciones crónicas.

#### V.6.1.221. El problema de la mandioca

La neuropatía atáxica y los diversos grados de fallas sensoriales que afectan a las poblaciones de Africa Occidental, han sido objeto de estudios en el mundo de la medicina durante varios años. Entre los factores involucrados en la etiología de esta enfermedad, se destaca la intoxicación crónica por cianuro que deriva de la ingestión de grandes cantidades de glucósidos cianogénicos incorporados en una dieta en la que predomina la raíz de la mandioca, la cual contiene linamarina (Conn, 1973).

Es probable que muchos de los daños neurológicos sean

causados directamente por el cianuro libre. Las concentraciones de cianuro en el plasma, en ausencia de cianuro exógeno, son muy pequeñas. El cianuro administrado tiende a ser secuestrado dentro de los eritrocitos, pero cuando la dosis aumenta, se produce acumulación de cianuro en el plasma (Vesey y Wilson, 1978). Aunque el cianuro es detoxificado por conversión a tiocianato, es posible que se exceda la capacidad de detoxificación del sistema. A dosis suficientes, entonces, el pool de azufre sulfano se agota y las células del sistema nervioso, entre otras, son irrigadas con un fluido conteniendo concentraciones significativas de HCN. Esta parece ser la situación en los humanos que consumen crónicamente grandes cantidades de materiales cianogénicos. Para la mayoría de las otras personas la velocidad de re-provisionamiento del pool sulfano y el efecto regulador ejercido por la captura del cianuro por las células rojas, son adecuados para mantener la concentración de cianuro libre en los fluidos extracelulares a niveles suficientemente bajos para evitar cualquier daño (Westley, 1980).

#### V.6.1.222. Interrelaciones nutricionales

Se sabe que el daño del cianuro es exacerbado por varias deficiencias nutricionales comunes. Una de ellas involucra a la vitamina B<sub>12</sub> (Wilson y Matthews, 1966). El cianuro mantiene a la vitamina B<sub>12</sub> como cianocobalamina, que es la forma inactiva. Así el cianuro tiene la capacidad potencial para crear una efectiva deficiencia de B<sub>12</sub>. Otra relación menos obvia tiene que ver con la riboflavina. Las dietas de Africa Occidental pueden ser precisamente deficientes en riboflavina; la falta de esta vitamina contribuye a la complejidad de las enfermedades características, en una manera que no es completamente razonable. Quizás la conexión más importante sea, que la dieta de las personas que subsisten principalmente de mandioca, es típicamente deficiente en proteínas. Esto es fundamental ya que si nuestro análisis de la participación del pool sulfano es correcto, la fuente primaria de la mayoría del azufre para la detoxificación del cianuro se logra ingiriendo cisteína y metionina. En realidad, el problema es doble ya que el pool sulfano deficiente no solamente no podrá detoxificar todo el cianuro sino que tampoco podrá cumplir con sus roles fisiológicos normales.



Otro problema relacionado con el cianuro que acosa a las poblaciones mandioca dependientes tiene que ver con la función tiroidea: el bocio es frecuente. Como los componentes del pool sulfano son convertidos a tiocianato, éste se acumula, debido a que no es excretado bien por los riñones. Aunque el tiocianato pasa bien a los glomérulos, es reabsorbido en los túbulos como lo es el cloruro. Desafortunadamente, este carácter pseudohalógeno también se extiende al comportamiento del tiocianato en el tejido tiroideo, donde compite con el ioduro, produciendo una insuficiencia tiroidea. Además, aunque la peroxidasa tiroidea (Maloof y Soodak, 1964), como otras peroxidases (Sörbo y Ljunggren, 1958; Oram y Reiter, 1966; Chung y Wood, 1970) es capaz de oxidar el tiocianato, los productos de la reacción son sulfato y cianuro; ésto revierte la detoxificación que se había logrado a expensas del pool sulfano.

De acuerdo a las consideraciones hechas aquí, el problema de la enfermedad de las poblaciones dependientes de mandioca es complejo y difícil.

#### V.6.2. Transferencia de azufre sulfano a otras proteínas

##### V.6.2.1. Formación de azufre "lábil" en ferro-proteínas no-hémicas a partir de tiosulfato

Las ferro-proteínas no-hémicas, que contienen sulfuro lábil son ubicuas y esenciales en los organismos vivos. Están funcionalmente ligadas al sistema de transporte de electrones, localizado en estructuras organizadas como cloroplastos o mitocondrias. El descubrimiento del DNA mitocondrial hizo suponer que las proteínas específicas podrían sintetizarse dentro de la mitocondria (Granick y Gibor, 1967). Sin embargo, es muy probable que los componentes no-proteicos de las proteínas conjugadas provengan del exterior de la organela. En el caso de las ferro-proteínas no-hémicas, tal proceso se refiere a la formación del sulfuro "lábil". Fee y Palmer (1971) demostraron que la recombinación del hierro con la apoferredoxina *in vitro* tiene lugar solamente en presencia de sulfuro y un agente reductor. Parece poco probable que el sulfuro inorgánico sea la fuente del sulfuro lábil *in vivo*. Por otra parte se sabe que el tiosulfato es metabolizado en la mitocondria formando sulfato (Koj y col, 1967).

Esto sugiere un posible rol para la rodenasa, enzima mitocondrial que catalizaría el transporte de azufre desde el tiosulfato a la apoferredoxina (Finazzi Agró y col, 1971) posibilitando así, la terminación de la síntesis de ferro-proteínas no-hémicas en el interior de la mitocondria.

Pagani y col (1982) estudiaron el comportamiento del azufre no aminoacídico unido a proteínas en la interacción entre rodenasa y ferredoxina de espinaca en presencia o ausencia de tiosulfato. Estos autores determinaron la cantidad y estado de oxidación (sulfuro, persulfuro, trisulfuro) del azufre en ambas proteínas y propusieron que el azufre es transferido desde la rodenasa a la ferredoxina, aunque también puede ocurrir en sentido inverso. La cantidad transferida y el estado de oxidación del azufre depende de las condiciones de las proteínas interactuantes y de la presencia o ausencia de tiosulfato, el cual hace funcionar a la rodenasa como una transferasa. Espectros de dicroismo circular indican una absorbancia aumentada de los centros hierro-azufre de la ferredoxina cuando esta proteína acepta azufre de la rodenasa. A su vez esta última es en parte inactivada en el proceso. La inactivación es disminuída por tiosulfato. Los pasos individuales de la transferencia, especialmente los concernientes a la reducción del azufre persulfuro de la rodenasa a sulfuro, parecen ser específicos para la proteína aceptoras considerada (Pagani y col, 1982).

#### V.6.2.2. Interacción entre rodenasa y succinato deshidrogenasa

La succinato deshidrogenasa contiene un tiol, un disulfuro y un azufre ácido lábil, éste último formando un complejo con hierro. El sistema azufre lábil-hierro está involucrado en la actividad catalítica (Dervartian y col, 1969) y en el mantenimiento de la capacidad de la flavoproteína para transferir electrones a otros carriers del sistema respiratorio (Baginsky y Hatefi, 1969). Dicho complejo es muy lábil. Ciertas evidencias (King, 1963; Kimura y Hauber, 1963; Baginsky y Hatefi, 1969; Hanstein y col, 1971) indican que una medida de la integridad de la succinato deshidrogenasa aislada, está dada por la capacidad reconstitutiva, por ejemplo la capacidad de la enzima soluble de restaurar un sistema oxidasa funcionando en las partículas sub-mitocondriales desactivado por álcalis.

Como se señaló en la sección anterior, se sabe que la rodenasa y el tiosulfato pueden sustituir al sulfuro inorgánico para restaurar la ferredoxina a partir de apoferredoxina en presencia de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  (Finazzi Agró y col, 1971). En base a estos resultados, Pagani y col (1975) efectuaron estudios para determinar si la rodenasa podía restaurar la capacidad reconstitutiva de la succinato deshidrogenasa. Los resultados obtenidos indican que la rodenasa interactúa con la succinato deshidrogenasa induciendo cambios que pueden estar relacionados a modificaciones en el centro hierro-azufre. Para que la rodenasa reaccione correctamente con la flavoproteína debe poseer azufre sulfano en su molécula. Además, el centro activo de la rodenasa interactuante no está disponible al tiosulfato externo. En este aspecto la acción de la enzima sobre la succinato deshidrogenasa difiere de la misma sobre la apoferredoxina, donde el efecto es estimulado por el agregado de tiosulfato (Finazzi Agró y col, 1971).

Como el tiosulfato externo no afecta la eficiencia de la acción de la rodenasa sobre la flavoproteína puede pensarse que el fenómeno descrito no involucre un cambio cuantitativo total del sulfuro lábil, o bien que existe un suministro interno de azufre a la rodenasa. En el primer caso como la succinato deshidrogenasa inactiva contiene sulfuro lábil, en presencia de rodenasa el arreglo puede ocurrir involucrando esta especie de azufre, para restaurar reconstitutivamente las moléculas activas. La segunda alternativa está sustentada por el trabajo de Petering y col (1971); estos autores comprobaron que cuando el sistema hierro-azufre es degradado bajo condiciones oxidantes, el azufre permanece unido a la molécula proteica como trisulfuro. Los trisulfuros son donores de azufre para la rodenasa (Westley, 1973) y en el presente caso, el azufre del trisulfuro formado a partir del sulfuro lábil en las moléculas desactivadas de la succinato deshidrogenasa, podría ser el átomo intercambiado.

En 1976, Bonomi y col reportaron que la rodenasa no forma un complejo estable con la succinato deshidrogenasa: probablemente actúa modificando el equilibrio de asociación de la flavoproteína hacia agregados de mayor peso molecular. La pequeña cantidad de rodenasa asociada con la succinato deshidrogenasa es inactiva en la catálisis de formación de tiocianato. Teniendo en cuenta consideraciones previas según las cuales el tiosulfato externo no afecta la acción de la rodenasa sobre la fla

voproteína (Pagani y col, 1975), se puede suponer que el sitio activo de la sulfotransferasa puede estar comprometido a la interacción con la flavoproteína.

Estudios posteriores efectuados por Bonomi y col (1977) determinaron que la capacidad reconstitutiva de la succinato deshidrogenasa aumentaba paralelamente con la incorporación de azufre luego de su interacción con rodenasa. La succinato deshidrogenasa incorpora azufre sulfano de ( $^{35}\text{S}$ )rodenasa y, en presencia de rodenasa no marcada, también incorpora azufre radioactivo de ( $^{35}\text{S}$ )tiosulfato. En este trabajo se postula que la rodenasa liberaría gran parte de su azufre transferible y sería re-cargada en presencia de tiosulfato. La liberación de azufre de rodenasa parece depender de la presencia de grupos -SH en la proteína aceptora (Bonomi y col, 1977).

#### V.6.2.3. Activación de malato deshidrogenasa por rodenasa

Hemos visto que ciertas proteínas intramitocondriales que contienen azufre lábil necesario para la formación de su grupo prostético, podrían ser los aceptores naturales del azufre sulfano transferido por la rodenasa (Finazzi Agró y col, 1971). Otra posibilidad es que algunas proteínas pueden cambiar su actividad fisiológica por unión de azufre lábil. El alcance químico de esta opción es la presencia de un gran número de residuos -SH esenciales en las proteínas mitocondriales. La malato deshidrogenasa de corazón porcino tiene grupos -SH esenciales que la hacen muy sensible a los metales pesados o reactivos sulfhidrúlicos. La malato deshidrogenasa mitocondrial pura muestra un aumento en su actividad específica cuando es incubada con tiosulfato y rodenasa (Finazzi Agró y col, 1976). Dicha activación podría deberse a la unión de azufre de valencia cero a la malato deshidrogenasa, ya que se obtiene un efecto análogo cuando la enzima es incubada en presencia de azufre coloidal. Selenosulfato y selenio coloidal, que pueden unirse a la rodenasa de igual modo que el azufre (Cannella y col, 1975 a), también activan la malato deshidrogenasa. Esta activación está relacionada con los grupos -SH de la enzima. Poco se sabe sobre la naturaleza de la unión de este azufre a la malato deshidrogenasa, pero la necesidad de los grupos -SH libres para la reactivación parece indicar la formación de grupos persulfuro. La actividad de esta enzima y quizás otras, sería regulada dentro de

la célula vía rodenasa (Finazzi Agró y col, 1976). Aquí cabe recordar el dramático efecto ejercido por el selenio en la mitocondria (Levander y col, 1973), el cual en cierta forma podría estar relacionado con este fenómeno de activación.

#### V.6.2.4. Interacción entre rodenasa y ALA-S

Debido a la importancia de esta interacción, la misma ha sido exhaustivamente analizada en los capítulos correspondientes a Regulación del metabolismo del hemo y ALA-S (III y IV).

REFERENCIAS

- Agnisola, C.; Fati, L.; Salvatore, S.; Scardi, V. & Genoino, I.T. (1981) *Comp. Biochem. Physiol.* 70B, 623.
- Anosike, E.O. & Ugochukwu, E.N. (1981) *J. Exp. Bot.* 32, 1021.
- Baginsky, M.L. & Hatefi, Y. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5313.
- Barton, C.P. & Akagi, J.M. (1971) *J. Bacteriol.* 107, 375.
- Bénard, H.; Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1948 a) *Compt. Rend. Soc. Biol.* 142, 150.
- Bénard, H.; Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1948 b) *Presse Med.* 56, 269.
- Bénard, H.; Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1949) *Rev. Pathol. Comparee Hyg. Gen.* 49, 72.
- Benzce, W.L. & Schmid, K. (1957) *Anal. Chem.* 29, 1193.
- Blumenthal, K.L. & Henrikson, R.L. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 2430.
- Blumenthal, K.L. & Henrikson, R.L. (1972 a) *Biochim. Biophys. Acta* 278, 530.
- Blumenthal, K.L. & Henrikson, R.L. (1972 b) *Biochim. Biophys. Acta* 278, 546.
- Bonomi, F.; Pagani, S.; Cannella, C. & Cerletti, P. (1976) en "Flavins and Flavoproteins" (Ed. T. P. Singer) Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam. Printed in The Netherlands. Cap. 59, p. 546.
- Bonomi, F.; Pagani, S.; Cerletti, P. and Cannella, C. (1977) *Eur. J. Biochem.* 72, 17.
- Bowen, T.J.; Butler, P.J. & Happold, F.C. (1965) *Biochem. J.* 95, 5p.
- Burnett, W.W.; King, E.G.; Grace, M. & Hall, W.F. (1977) *Can. Med. Assoc. J.* 117, 1277.
- Bryant, R.C. & Rajender, S. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 532.
- Cannella, C.; Pecci, L.; Finazzi Agró, A.; Federici, G.; Pensa, B. & Cavallini, D. (1975 a) *Eur. J. Biochem.* 55, 285.
- Cannella, C.; Pecci, L.; Costa, M.; Pensa, B. & Cavallini, D. (1975 b) *Eur. J. Biochem.* 56, 283.

- Cannella, C.; Pecci, L.; Ascoli, F.; Costa, M.; Pensa, B. & Cavallini, D. (1980) en "Natural Sulfur Compounds" (Eds. Cavallini, D.; Gaull, G.E. & Zappia, V.) Plenum Press, New York. p. 471.
- Cannella, C.; Costa, M.; Pensa, B.; Ricci, G.; Pecci, L. & Cavallini, D. (1981) Eur. J. Biochem. 119, 491.
- Castrella Bertran, E. (1954) 10th. Congr. Intern. Ind. Agr. Aliment. Madrid, p. 769.
- Catignani, G.L. & Neal, R.A. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 629.
- Cavallini, D.; Mondovi, B.; DeMarco, C. & Scioscia-Santoro, A. (1962) Enzymologia 24, 253.
- Cavallini, D.; Mondovi, B. & DeMarco, C. (1963) Biochem. Prep. 10, 72.
- Clemedson, C.J.; Fredricksson, T.; Hansen, B.; Hultman, H. & Sörbo, B. (1958) Acta Physiol. Scand. 42, 41.
- Coltorti, M. & Giusti, G. (1956 a) Enzymologia 17, 256.
- Coltorti, M. & Giusti, G. (1956 b) Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 32, 1094.
- Conn, E.E. (1973) en "Toxicants Occurring Naturally in Foods" Nat. Acad. Sci. Washington, D.C. p.299.
- Cosby, E.L. & Summer, J. B. (1945) Arch. Biochem. 7, 457.
- Cristel, D.; Eyer, P.; Hegemann, M.; Keise, M.; Lörcher, W. & Weger, N. (1977) Arch. Toxicol. 38, 177.
- Chew, M.Y. (1973) Phytochemistry 12 (10), 2365.
- Chew, M.Y. & Boey, C.G. (1972) Phytochemistry. 11, 167.
- Chou, P.Y. & Fasman, G.D. (1974) Biochemistry 13, 222.
- Chung, J. & Wood, J.L. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 141, 73.
- Chung, J. & Wood, J.L. (1971) J. Biol. Chem. 246, 555.
- Davidson, B. & Westley, J. (1965) J. Biol. Chem. 240, 4463.
- Davis, R.E. (1962) J. Phys. Chem. 66, 956.
- DeDuve, C.; Pressman, B.C.; Gianetto, R.; Wattiaux, R. & Appelmans, F. (1955) Biochem. J. 60, 604.
- DeMatteis, F. (1974) Mol. Pharmacol. 10, 849.

- DeRitis, F.; Coltorti, M. & Giusti, G. (1954) *Biochim. Appl.* 1, 57.
- Dervartanian, D.V.; Veeger, C.; Orme Johnson, W.H. & Beinert, H. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 191, 22.
- DeToma., F. & Westley, J. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 207, 144.
- Drenth, J. & Smith, J.D.G. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45, 1320.
- Dudek, M.; Frenedo, S. & Koj, A. (1979) *Comp. Biochem. Physiol.* 65B, 383.
- Edelhoch, H. (1967) *Biochemistry* 6, 1918.
- Ellis, L.M. & Woodward, C.K. (1975) *Biochim. Biophys. Acta.* 379, 385.
- Eriksson, B. & Sörbo, B. (1967) *Acta Chem. Scand.* 21, 958.
- Fee, J.A. & Palmer, G. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 245, 175.
- Finazzi Agró, A.; Cannella, C.; Graziani, M.T. & Cavallini, D. (1971) *FEBS Letters* 16, 172.
- Finazzi Agró, A.; Federici, G.; Giovagnoli, C.; Cannella, C. & Cavallini, D. (1972) *Eur. J. Biochem.* 28, 89.
- Finazzi Agró, A.; Mavelli, J. ; Cannella, C. & Federici, G. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 553.
- Flavin, M. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 768.
- Flavin, M. & Segal, A. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 2220.
- Frankenberg, L. & Sörbo, B. (1975) *Arch. Toxicol.* 33, 177.
- Gemeinhardt, K. (1938) *Ber. Deut. Botan. Ges.* 56, 275.
- Gemeinhardt, K. (1939) *Süddeut. Apoth. Z.* 79, 256.
- Giast, J.H.; Arai, K. & Aldrich, F.L. (1952) *J. Biol. Chem.* 196, 875.
- Goldstein, F. & Rieders, F. (1953) *Amer. J. Physiol.* 173, 287.
- Granick, S. & Gibor, A. (1967) en "Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology" (Eds. J.H. Davidson and W.E. Cohn) Academic Press, New York. Vol 6, p. 143.
- Green, J.R. & Westley, J. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 3047.



- Greenberg, D. M. (1975) en "Metabolic Pathways" 3rd Edition (Ed. D.M. Greenberg) Academic Pres, New York Vol 7, p. 505.
- Greville, G.D. & Chapell, J.B. (1959) Biochim. Biophys. Acta 33, 267.
- Hall, R.M. & Berk, R.S. (1968) Can. J. Microbiol. 14, 515.
- Hanstein, W.G.; Davis, K.A.; Ghalambor, M.A. & Hatefi, Y. (1971) Biochemistry 10, 2517.
- Harris, C.L. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 599.
- Harris, C.L.; Kerns, F.T. & St. Clair, W. (1975) Cancer Res. 35, 3608.
- Himwich, W.A. & Saunders, J.P. (1948) Amer. J. Physiol. 153, 348.
- Horowitz, P. & Westley, J. (1970) J. Biol. Chem. 245, 986.
- Hunter, A.L. & Neal, R.A. (1975) Biochem. Pharmacol. 24, 2199
- Hylin, J. W. & Wood, J. L. (1959) J. Biol. Chem. 234, 2141.
- Jarabak, R. & Westley, J. (1974 a) Biochemistry 13, 3233.
- Jarabak, R. & Westley, J. (1974 b) Biochemistry 13, 3237.
- Jarabak, R. & Westley, J. (1974 c) Biochemistry 13, 3240.
- Jarabak, R. & Westley, J. (1978) Arch.Biochem.Biophys. 185, 458.
- Jarabak, R. & Westley, J. (1980) Biochemistry 19, 900.
- Järvisalo, J.; Gibbs, A.H. & DeMatteis, F. (1978) Mol. Pharmacol. 14, 1099.
- Kaji, A. & McElroy, W.D. (1959) J. Bacteriol. 77, 630.
- Kamataki, T. & Neal, R.A. (1976) Mol. Pharmacol. 12, 933.
- Kellogg, W.W.; Cadle, R.D.; Allen, F.R.; Lazrus, A.L. & Martell, E.A. (1972) Science 175, 587.
- Kice, J.L. (1968) Accounts Chem. Res. 1, 58.
- Kice, J.L. (1971) en "Sulfur in Organic and Inorganic Chemistry" (Ed. A. Senning), Dekker, New York 1, p. 153.
- Kimura, T. & Hauber, J. (1963) Biochem. Biophys. Res. Commun. 13, 169.
- King, T.E. (1963) J. Biol. Chem. 238, 4037.
- Koj, A. (1968) Acta Biochim.Polon. 15, 161.
- Koj, A. & Frendo, J. (1962) Acta Biochim. Polon. 9, 373.
- Koj, A.; Frendo, J. & Janik, Z. (1967) Biochem. J. 103, 791.

- Koj, A.; Frenedo, J. & Woitczack, L. (1975) FEBS Lett. 57, 42.
- Koj, A.; Michalik, M. & Kasperczyk, H. (1977) Bull. Acad. Pol. Sci., Sér. Sci. Biol. 25, 1.
- Lang, K. (1933 a) Biochem. Z. 259, 243.
- Lang, K. (1933 b) Biochem. Z. 263, 262.
- Lang, K. (1949) Z. Vitamin., Hormon-Fermentforsch 2, 288.
- Lang, S. (1894) Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol. 34, 247.
- Lang, S. (1895) Arch. Exptl. Pathol. Pharmakol. 36, 75.
- Leininger, K.R. & Westley, J. (1968) J. Biol. Chem. 243, 1392.
- LeJohn, H.B.; Van Caesele, L. & Lees, H. (1967) J. Bacteriol. 94, 1484.
- Levander, O.A.; Morris, V.C. & Higgs, D. J. (1973) Biochemistry 12, 4586.
- Ludewig, S. & Chanutin, A. (1950) Arch. Biochem. 29, 441.
- Maloof, F. & Soodak, M.J. (1964) J. Biol. Chem. 239, 1995.
- Matsuo, Y. & Greenberg, D.M. (1958) J. Biol. Chem. 230, 545.
- Mc Chesney, C.A. (1958) Nature 181, 347.
- Meister, A.; Fraser, P.E. & Tice, S.V. (1954) J. Biol. Chem. 206, 561.
- Mintel, R. & Westley, J. (1966 a) J. Biol. Chem. 241, 3381.
- Mintel, R. & Westley, J. (1966 b) J. Biol. Chem. 241, 3386.
- Neal, R.A.; Kamataki, T. & Catignani, C. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1044.
- Oram, J.D. & Reiter, B. (1966) Biochem. J. 100, 382.
- Pagani, S.; Cannella, C.; Cerletti, P. & Pecci, L. (1975) FEBS Letters 51, 112.
- Pagani, S.; Bonomi, F. & Cerletti, P. (1982) Biochim. Biophys. Acta 700, 154.
- Parsons, J. & Rothschild, M. (1962) J. Insect Physiol. 8, 285.
- Pecci, L.; Cannella, C.; Pensa, B.; Costa, M. & Cavallini, D. (1980) Biochim. Biophys. Acta 623, 348.
- Pensa, B.; Costa, M.; Pecci, L.; Cannella, C. & Cavallini, D. (1977) Biochim. Biophys. Acta 484, 368.

- Pensa, B.; Costa, M.; Cannella, C.; Pecci, L. & Cavallini, D. (1980) *Ital. J. Biochem.* 29, 266.
- Petering, D.; Fee, J. A. & Palmer, G. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 634.
- Ploegman, J.H. (1977) Ph. D. dissertation, University of Gröningen.
- Ploegman, J.H.; Drent, G.; Kalk, K.H. & Hol, W.G. J. (1978 a) *J. Mol. Biol.* 123, 557.
- Ploegman, J.H.; Drent, G.; Kalk, K.H.; Hol, W.G.J.; Henrikson, R.L.; Keim, P.; Weng, L. & Russell, J. (1978 b) *Nature* 273, 124.
- Ploegman, J.H.; Drent, G.; Kalk, K.H. & Hol, W.G.J. (1979) *J. Mol. Biol.* 127, 149.
- Russell, J.; Weng, L.; Keim, P.S. & Henrikson, L. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 8102.
- Sakai, S. (1960) *Kyoto Furitsu Ika Daigaku Zasshi* 67, 759.
- Sargeant, K.; Buck, P.W.; Ford, J.W.S. & Yeo, R.G. (1966) *Appl. Microbiol.* 14, 998.
- Sato, T. & Hayashi, T. (1952) *J. Japan. Biochem. Soc. Seikagaku* 24, 123.
- Saunders, J.P. & Himwich, W.A. (1950) *Amer. J. Physiol.* 163, 404.
- Scott, E. & Wright, R. (1980 a) *Am. J. Genet.* 32, 112.
- Scott, E. & Wright, R. (1980 b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 1339.
- Schievelbein, H.; Baumeister, R. & Vogel, R. (1969) *Naturwissenschaften* 56, 416.
- Schlesinger, P. & Westley, J. (1972) *Federation Proc.* 32, 628 abs.
- Schlesinger, P. & Westley, J. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 780.
- Schneider, J.F. & Westley, J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5735.
- Schook, L.B. & Berk, R.S. (1978) *J. Bacteriol.* 133, 1377.
- Seawright, A.A.; Hrdlicka, J. & Mattise, F. (1976) *J. Exp. Pathol.* 57, 16.
- Sido, B. & Koj, A. (1972) *Acta Biologica Crac.* 15, 97.
- Silver, M. & Kelly, D.P. (1976) *J. Gen. Microbiol.* 97, 277.

- Smith, A.J. & Lascelles, J. (1966) *J. Gen. Microbiol.* 42, 357.
- Smith, J.D.G.; Ploegman, J.H.; Kalk, K.H.; Jansonius, J.N. & Drenth, J. (1974) *Isr. J. Chem.* 12, 287.
- Spies, J.R. & Chambers, D.C. (1949) *Anal. Chem.* 21, 1249.
- Sörbo, B.H. (1951 a) *Acta Chem. Scand.* 5, 1218.
- Sörbo, B.H. (1951 b) *Acta Chem. Scand.* 5, 724.
- Sörbo, B.H. (1953 a) *Acta Chem. Scand.* 7, 32.
- Sörbo, B.H. (1953 b) *Acta Chem. Scand.* 7, 1129.
- Sörbo, B.H. (1953 c) *Acta Chem. Scand.* 7, 1137.
- Sörbo, B. (1954) *Acta Chem. Scand.* 8, 694.
- Sörbo, B. (1957 a) *Acta Chem. Scand.* 11, 628.
- Sörbo, B. (1957 b) *Biochim. Biophys. Acta* 24, 324.
- Sörbo, B. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 38, 349.
- Sörbo, B.H. (1962 a) *Acta Chem. Scand.* 16, 243.
- Sörbo, B.H. (1962 b) *Acta Chem. Scand.* 16, 2455.
- Sörbo, B.H. (1963 a) *Acta Chem. Scand.* 17, 2205.
- Sörbo, B.H. (1963 b) *Acta Chem. Scand.* 17, 5107.
- Sörbo, B.H. (1964) *Acta Chem. Scand.* 18, 821.
- Sörbo, B.H. (1972) en "Sulfur in Organic and Inorganic Chemistry" (Ed, A. Senning) Dekker, New York, p. 143.
- Sörbo, B.H. (1975) en "Metabolic Pathways" 3rd Edition (Ed D.M. Greenberg) Academic Press, New York. Vol 7, p. 433.
- Sörbo, B.H. & Ljunggren, J.G. (1958) *Acta Chem. Scand.* 12, 470.
- Szczepkowski, T.W. (1961) *Acta Biochim. Polon.* 8, 251.
- Szczepkowski, T.W. & Wood, J.L. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 139, 469.
- Tabita, R.; Silver, M. & Lundgren, D.G. (1969) *Can. J. Biochem.* 47, 1141.
- Thiens, C.H. & Haley, T.J. (1964) "Clinical Toxicology" Lea & Febiger, Philadelphia, Pennsylvania.
- Tomati, V.; Federici, G. & Cannella, C. (1972) *Physiol. Chem. Phys.* 4, 193.
- Traeger, J. & Linde, O. (1901) *Arch. Pharm.* 239, 121.

- Uhteg, L. & Westley, J. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 195, 211.
- Vachek, H. & Wood, J.L. (1972) Biochim. Biophys. Acta 258, 133.
- Vandenberg, P.A. & Berk, R.S. (1980) Can. J. Microbiol. 26, 281.
- Vandenberg, P.A.; Bawdon, R.E. & Berk, R.S. (1979) Int. J. Syst. Bacteriol. 29, 339.
- Van Den Hamer, C.J.A.; Morell, A.G. & Scheinberg, I.H. (1967) J. Biol. Chem. 242, 2514.
- Vesey, C.J. & Wilson, J. (1978) J. Pharm. Pharmacol. 30, 20.
- Villarejo, M. & Westley, J. (1963 a) J. Biol. Chem. 238, R.C. 1186.
- Villarejo, M. & Westley, J. (1963 b) J. Biol. Chem. 238, 4016.
- Villarejo, M. & Westley, J. (1966) Biochim. Biophys. Acta 117, 209.
- Volini, M. & Wang, S.F. (1971) Federation Proc. 30 1265 abs.
- Volini, M. & Wang, S.F. (1972) Federation Proc. 32, 628 abs.
- Volini, M. & Wang, S.F. (1973 a) J. Biol. Chem. 248, 7386.
- Volini, M. & Wang, S.F. (1973 b) J. Biol. Chem. 248, 7392.
- Volini, M. & Westley, J. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5168.
- Volini, M.; DeToma, F. & Westley, J. (1967) J. Biol. Chem. 242, 5220.
- Volini, M.; Craven, D. & Ogata, K. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7591.
- Wang, S.F. & Volini, M. (1968) J. Biol. Chem. 243, 5465.
- Wang, S.F. & Volini, M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7376.
- Weng, L.; Russell, J. & Henrikson, R.L. (1978 a) J. Biol. Chem. 253, 8093.
- Weng, L.; Henrikson, R.L. & Westley, J. (1978 b) J. Biol. Chem. 253, 8109.
- Westley, J. (1959) J. Biol. Chem. 234, 1857.
- Westley, J. (1972) Bioinorg. Chem. 1, 245.
- Westley, J. (1973) Adv. Enzymol. 39, 327.

- Westley, J. (1977) Bioorg. Chem. 1, 371.
- Westley, J. (1980) en "Enzymatic Basis of Detoxication". Biochemical Pharmacology and Toxicology. A series of Monographs. (Ed. William. B. Jakoby). Academic Press, New York, II, p. 245.
- Westley, J. & Green, J.R. (1959) J. Biol. Chem. 234, 2325.
- Westley, J. & Heyse, D. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1468.
- Westley, J. & Nakamoto, T. (1962) J. Biol. Chem. 237, 547.
- Wider de Xifra, E.A.; Sandy, J.D.; Davies, R. & Neuberger, A. (1976) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 273, 79.
- Wilson, J. (1965) Clin. Sci. 29, 505.
- Wilson, J. (1973) Cyanide and human disease. En "Chronic Cassava Toxicity" (Eds. B. Nestel and R. MacIntyre), Monogr. Int. Dev. Res. Cent. Ottawa, Canada IDRC-010e, p. 121.
- Wilson, J. & Matthews, D.M. (1966) Clin. Sci. 31, 1.
- Wong, T.W.; Weiss, S.B.; Eliceiri, G.L. & Bryant, J. (1970) Biochemistry 9, 2376.
- Wong, T.W.; Harris, M.H. & Jankowicz, C.A. (1974) Biochemistry 13, 2805.
- Wong, T.W.; Harris, M.H. & Morris, H.P. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 1137.
- Wood, J.L. & Fiedler, H. (1953) J. Biol. Chem. 205, 231.
- Yoch, D.C. (1971) J. Bacteriol. 106, 700.

PORFIRIAS

---

	Página
VI.1. Generalidades	173
VI.2. Clasificación de las porfirias	173
VI.2.1. Porfirias eritropoyéticas	174
VI.2.1.1. Porfiria Congénita	174
VI.2.1.2. Protoporfiria Eritropoyética	177
VI.2.1.3. Coproporfiria Eritropoyética Congénita	180
VI.2.2. Porfirias hepáticas	181
VI.2.2.1. Porfiria Cutánea Tardía	182
VI.2.2.2. Porfiria Aguda Intermitente	187
VI.2.2.3. Porfiria Variegata	192
VI.2.2.4. Coproporfiria Hereditaria	194
VI.2.2.5. Porfiria Aguda de Doss	196
VI.2.3. Porfiria Hepatoeritrocitaria	197
VI.2.4. Porfirinurias	197
VI.2.4.1. Intoxicación por plomo	197
Referencias	201

## VI. PORFIRIAS

### VI.1. GENERALIDADES

Las porfirias son enfermedades hereditarias o adquiridas producidas por disturbios en la biosíntesis del hemo que se caracterizan por la excesiva producción, acumulación y excreción de porfirinas y/o sus precursores: ALA y PBG. Generalmente estas enfermedades están asociadas con síndromes clínicos definidos, si bien pueden presentarse a veces, sólo como anomalías bioquímicas.

En 1954, Schmid y col, considerando que los tejidos en los cuales se expresaban fundamentalmente eran hígado y médula ósea, propusieron una división de las porfirias en dos grupos principales: hepáticas y eritropoyéticas que todavía hoy se mantiene, aunque con cierta frecuencia se encuentran porfirias que, de acuerdo a sus manifestaciones clínicas y bioquímicas, no pueden ubicarse estrictamente en una de esas clases, o bien hay casos de un compromiso variado de ambos tejidos.

### VI.2. CLASIFICACION DE LAS PORFIRIAS

En 1981, Batlle y col adoptaron la siguiente clasificación:

- . Eritropoyéticas: Porphiria congénita eritropoyética (PCE)
  - Protoporphiria eritropoyética (PPE)
  - Coproporphiria eritropoyética (CPE)
- . Hepáticas: Porphiria Cutánea Tardía (PCT)
  - Porphiria Aguda Intermittente (PAI)
  - Porphiria Variegata (PV)
  - Coproporphiria hereditaria (CPH)
  - Nueva Porphiria Aguda de Doss
- . Porphiria Hepatoeritrocitaria
- . Porphirinurias



### VI.2.1. Porfirias eritropoyéticas

De todos los síndromes porfíricos, el denominado "eritropoyético" puede presentar los signos clínicos y bioquímicos más espectaculares, y constituir uno de los problemas más difíciles.

Dentro de las porfirias incluídas en este grupo, las dos primeras, PCE y PPE han sido muy estudiadas; la CPE es muy rara y existen pocos casos descriptos (Heilmeyer y Clotten, 1964; Heilmeyer y col, 1966).

Las características clínicas y bioquímicas de la PCE y PPE están perfectamente establecidas y diferenciadas entre sí, de manera que no puede haber confusión con otras porfirias

#### VI.2.1.1. Porfiria congénita

La PCE o enfermedad de Günther es el arquetipo de las porfirias y en muchos sentidos la más severa de todas.

Encontramos referencias al respecto ya desde el siglo pasado, y en las primeras décadas de este siglo el gran clínico alemán Günther (Günther, 1911, 1922) describió la severa cicatrización y mutilación de la piel en un caso que podríamos definir como una típica PCE. Este paciente, llamado Petry, fue intensamente estudiado por el bioquímico Hans Fischer en Munich. Como consecuencia de ello se hicieron importantes avances en el conocimiento de la química de las porfirias. Dicho paciente era un caso severo de porfiria congénita que acumulaba en tejidos y excretaba por orina grandes cantidades de porfirinas cuya identificación y caracterización se deben a Fisher.

#### - Prevalencia y genética

La PCE es una de las porfirias más raras, aunque es probablemente una de las más conocidas. Hay quizás menos de cien pacientes descriptos en la literatura y a lo largo de los años ha habido más o menos una regular incidencia de casos reportados, observándose además que puede ocurrir en un amplio rango de grupos raciales, asiáticos, africanos, mongoles y europeos.

La genética de la porfiria congénita ha sido estudiada relativamente bien y actualmente se acepta que se transmite en

forma autosómica recesiva (Chatterji y col, 1963; Darocha y col, 1971; Bhutani y col, 1974; Pain y col, 1975). Pueden existir casos latentes (Heilmeyer y col, 1963; Pain y col, 1975).

#### - Cuadro clínico

Brevemente, la enfermedad se presenta con una marcada fotosensibilidad de la piel con lesiones bulloso-erosivas que dejan severas cicatrices, cambios pseudoesclerodérmicos y pigmentarios, asociados con aumento del crecimiento del pelo. Las alteraciones en ojos y dientes son comunes, así como la anemia hemolítica y la esplenomegalia.

Comienza a manifestarse en edad temprana. El primer hecho, que puede ser advertido por la madre del paciente, es el color rosado que deja la orina en los pañales. También puede notarse que el niño está más irritado cuando permanece expuesto cierto tiempo a la luz solar.

Estos ataques agudos de fotosensibilidad pueden continuar intermitentemente durante unos años. En la segunda década de vida, sin embargo, la enfermedad suele presentarse como una forma erosivo-bullosa en las partes expuestas de la piel, tal vez como consecuencia de la exposición solar y también ocurre un aumento de la susceptibilidad de la piel a pequeños traumatismos. Las lesiones llegan a ser particularmente molestas en las manos y también en pies y cara. Pueden formarse úlceras que tienden a dejar cicatrices. Los dedos de las manos y a veces de los pies quedan raquíuticos y presentan daños en los huesos periféricos. Las lesiones de los cartílagos nasales y auriculares son también características dando a la cara un típico aspecto mutilado. Puede ocurrir alopecia en cuero cabelludo y pérdida de cejas y pestañas. Eventualmente, la evolución temporal podría llevar a un extenso endurecimiento de la piel del tronco y de los miembros, lo bastante severo como para simular una esclerodermia.

Asociado con estos signos desfigurantes existe como contrapartida un patrón característico de hipertrichosis, especialmente en la cara. En la porfiria congénita leve, sin lesiones erosivo-bullosas ni cicatrizales, éste puede ser un signo capital y contribuir de manera importante al diagnóstico clínico correcto.

Otra característica clínica peculiar es la eritrodoncia. Consiste en un cambio de color, a gris o marrón de alguno de los

dientes, y es causado por depósitos de porfirinas en los mismos; esto puede comprobarse por la fluorescencia roja que emiten cuando se los observa bajo luz UV.

La anemia es de tipo hemolítico (Magnus, 1982).

- Cuadro bioquímico

El defecto básico es una actividad deficiente de la enzima uroporfirinógeno IIIcosintetasa o isomerasa, o un balance incorrecto entre esta enzima y la uroporfirinógeno I sintetasa o deaminasa (Romeo y Levin, 1969; Levin, 1975; Gidari y Levere, 1977; Moore y col, 1978) (Figura VI.1.).

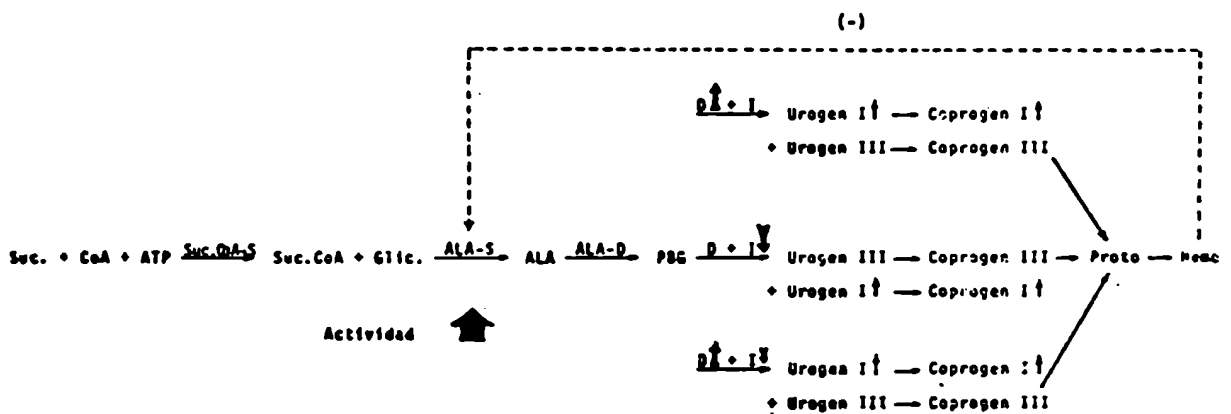


FIGURA VI.1.: Posibles modelos para explicar el patrón de excreción anormal de isómeros tipo I en la porfiria congénita eritropoyética. D:deaminasa; I: isomerasa.

Ello se refleja en las porfirinas eliminadas (uroporfirina, coproporfirina y otras porfirinas con número intermedio de grupos carboxílicos) que pertenecen a la serie isomérica I. La cantidad total de porfirinas excretadas por orina está muy incrementada. Predominan uro y coproporfirina y por lo tanto difiere claramente del patrón de la porfiria cutánea tarda, en la que se observa predominio de las porfirinas octa y heptacarboxílicas.

Cuando se examina una muestra de sangre fresca, protegida de la luz, pueden verse fluorocitos. Estos muestran un color rojo-naranja bastante notable y permanecen casi sin cambios durante una hora o más permitiendo fácilmente su microfotografía. En la protoporfiria eritropoyética, donde también encontramos fluoro

cidos, la fluorescencia es evanescente; cuando se mira con el microscopio de fluorescencia se comprueba que permanece menos de un minuto (Magnus, 1982).

#### - Tratamiento

No hay un tratamiento adecuado y se recurre generalmente a medidas preventivas.

Se ha propuesto la esplenectomía como correctora de la anemia y también de la fotosensibilidad, aunque sólo en pocos casos se han obtenido resultados positivos.

La fotosensibilidad puede reducirse evitando el sol. Pueden emplearse  $\beta$ -carotenos orales aunque éstos no parecen ayudar mucho (Ippen y Fuchs, 1980). La confección de barreras solares constituye un problema, ya que deben ser efectivas contra la luz visible y en este caso sólo son útiles las preparaciones que contienen sustancias reflectantes como el óxido de zinc. Estas cremas son antiestéticas y por lo tanto su uso no es agradable.

Las medidas ideadas para aliviar el principal defecto metabólico son enumeradas por Ippen y Fuchs (1980) e incluyen pequeñas dosis de cloroquina (usada también en la Porfiria Cutánea Tarda), purinas, p-aminobenzoato y corticosteroides. Se ha indicado la alcalinización metabólica para aumentar la excreción urinaria de porfirinas. Se ha intentado inhibir la actividad eritropoyética por hipertransfusión, o la biosíntesis de porfirinas con aplicaciones i.v. de hematina. Recientemente, Buthani (1982) ha utilizado ciclofosfamida con buen resultado en un paciente, en dos ocasiones separadas, obteniendo una prolongada remisión clínica y bioquímica.

#### VI.2.1.2. Protoporfiria Eritropoyética (PPE)

El primer caso fue descrito en 1953 por un pediatra alemán: Kosenow (Kosenow y Treibs, 1953) aunque no tuvo mayor trascendencia. En 1961 varios dermatólogos refirieron los siguientes casos de PPE (Langhoff y col, 1961; Magnus y col, 1961).

Precisamente, Magnus y col (1961) efectuaron un intensivo estudio de esta porfiria, que permitió su posterior caracterización clínica y bioquímica.

### - Prevalencia y genética

La enfermedad probablemente afecta a todas las razas, pero la prevalencia difiere ampliamente de unos países a otros. Para los dermatólogos del norte de Europa, la PPE está entre los tipos más comunes de porfiria; en algunos lugares, Londres por ejemplo, es incluso más común que la PCT.

La genética de la PPE ha sido estudiada por muchos autores, los primeros trabajos fueron efectuados por Haeger-Arönsen (1963). La transmisión es claramente dominante, pero con un grado variable de penetrancia.

### - Cuadro clínico

La PPE es una enfermedad de inicio precoz, principalmente con síntomas subjetivos de fotosensibilidad, que pueden ser severos y completamente desproporcionados de acuerdo a hallazgos observables bioquímicamente. En la mayoría de los pacientes los signos son exclusivamente cutáneos, rara vez hay complicaciones hepáticas.

Las primeras manifestaciones pueden aparecer durante el primer año de vida, como en la porfiria congénita. Los signos de fotosensibilidad pueden presentarse aún en piel no expuesta pero cubierta con ropas traslúcidas y en este aspecto los síntomas de la PPE difieren de las quemaduras solares normales. La PPE se diferencia de la PCE en que la orina es prácticamente normal, es decir no se observa exceso de porfirinas (Magnus, 1982).

El cuadro clínico de la PPE es algo distinto al que encontramos en otros tipos de porfirias cutáneas. Las características ampollas erosivas de la PCT, PV y PCE, así como el pseudoescleroderma, los cambios pigmentarios difusos y la hipertricosis están ausentes en la PPE. A medida que el paciente crece, el cuadro que domina es el de una fotosensibilidad subjetiva de la piel; los síntomas son más completos que los vistos en el niño. El paciente suele describir como, después de estar expuesto directamente a la luz solar durante un tiempo (variable de 1-2 minutos a media hora), desarrolla una sensación aguda de quemazón, pinchazos y, con menos frecuencia, prurito. Esto ocurrirá habitualmente en cualquier área de la piel expuesta. El período de latencia que transcurre entre el fin de la exposición y el inicio de los síntomas puede variar de cero a 1 ó 2 horas y es, desde luego

más corto que el observado en las quemaduras solares normales; este dato es útil para el diagnóstico diferencial de PPE.

Otros cambios encontrados en los pacientes son eritema, edema, petequias y raramente franca urticaria solar (Magnus y col, 1961).

Conforme pasa el tiempo, estos síntomas agudos tienden a ser menos severos.

#### - Cuadro Bioquímico

Se piensa generalmente que el cuadro bioquímico característico reside en un aumento de la protoporfirina en hematíes, la cual está más en forma libre que quelada con zinc, tal como sucede en la intoxicación por plomo y en la anemia sideroblástica. La deficiencia enzimática específica está ubicada a nivel de la ferroquelatasa y se ha reportado un aumento secundario del ALA-S (Schwartz y col, 1971) (Figura VI.2.).

Examinando diluciones de sangre fresca en el microscopio de fluorescencia pueden verse fluorocitos rojo-anaranjados, de corta vida (10 segundos o menos). La proporción de fluorocitos es variable y al parecer depende directamente de la proporción de células rojas nuevas (Piomelli y col, 1975).

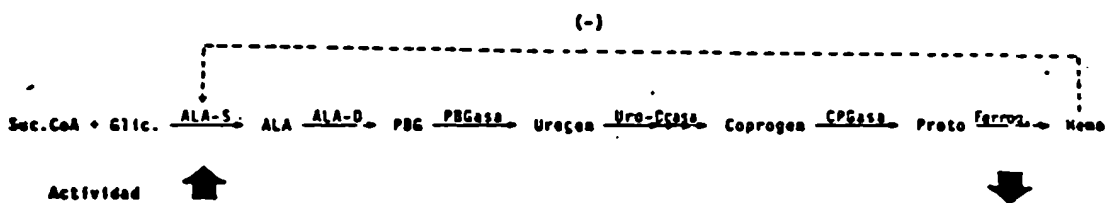


FIGURA VI.2.: Relación entre la deficiencia enzimática primaria de ferroquelatasa y el aumento de ALA-S en protoporfiria eritropoyética. Ferroq.: ferroquelatasa.

La protoporfirina está elevada en glóbulos rojos. La coproporfirina puede ser normal o estar ligeramente aumentada, la uroporfirina es indetectable.

Las porfirinas en heces pueden ser normales o mostrar un aumento moderado de proto con valores normales para las otras porfirinas.

Como se mencionó la orina es normal, excepto en un estado terminal de falla hepática en el que se ha descrito un aumento de las fracciones uro y coproporfirina en algunos pacientes (Magnus, 1982).

Las complicaciones de la PPE son raras y se limitan al hígado. Se manifiestan como colelitiasis o cirrosis. Ambas parecen estar asociadas a una concentración elevada de protoporfirina hepática, que puede deberse a un aumento de la captación de protoporfirina sanguínea o a un aumento de su síntesis por este órgano, o a ambos fenómenos simultáneamente.

El resto del cuadro sanguíneo de la PPE generalmente es normal, en contraste con el de la enfermedad de Günther. Los signos de anemia hemolítica son muy raros (Magnus, 1982).

#### - Tratamiento

El tratamiento de la PPE es exclusivamente preventivo. El objetivo principal es educar al paciente para que evite el sol y lleve ropas protectoras.

Algunas de las medidas usadas en la PCE se han propuesto para la PPE, por ejemplo la hipertransfusión y el uso de carotenoides orales, sin mayor éxito, aunque inocuos.

#### VI.2.1.3. Coproporfiria eritropoyética congénita

Heilmeyer y Clotten (1964, 1966) describieron dos casos de esta variable de porfiria eritropoyética, caracterizada por trastornos de fotosensibilización con significativo aumento de coproporfirina III en glóbulos rojos, y cantidades incrementadas de copro y proto en materia fecal, lo cual se debe a una deficiencia de la CPGasa, que se transmitiría según un carácter dominante autosómico.

Desde el punto de vista clínico dijimos que se observa fotosensibilización de tipo leve con prurito, edema y tumefacción de las zonas expuestas, con recaídas ante cada nueva exposición, sin dejar cicatrices.

Dicha fotosensibilización no tendría fácil explicación a través del depósito de coproporfirina en la piel, ya que la misma sólo ha sido encontrada en glóbulos rojos. Según Heilmeyer y Clotten (1964), aunque se demostrara su existencia en piel, la

copro produciría una fotosensibilización mínima.

- Tratamiento

Se deben aplicar las medidas conducentes a evitar la acción de la luz que serán señaladas en las variedades de porfirias cutáneas.

VI.2.2. Porfirias hepáticas

Las porfirias hepáticas se caracterizan por una excesiva excreción de porfirinas y/o precursores en la orina (Figura VI.3.).

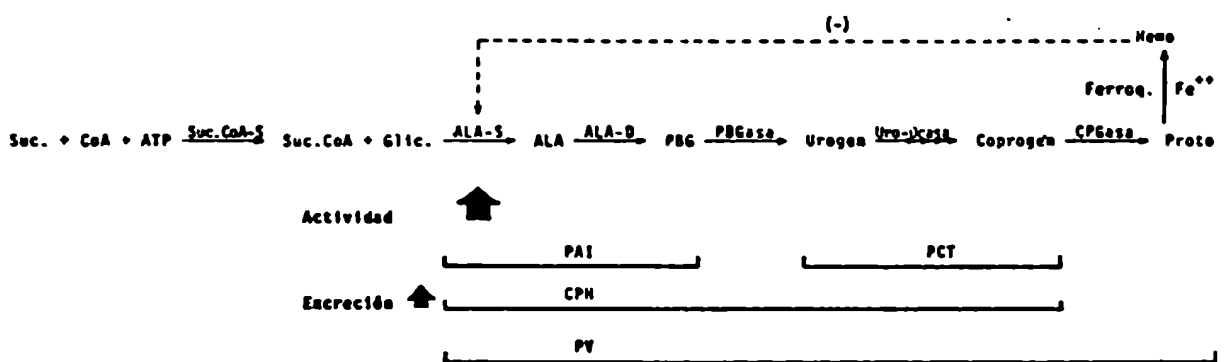


FIGURA VI.3.: Patrón de excreción urinaria de porfirinas y/o precursores en las porfirias hepáticas. En todas ellas la actividad del ALA-S está aumentada en hígado. Entre barras están indicados los intermediarios del camino del hemo que se excretan en forma elevada durante las fases agudas de las porfirias. PAI: Porfiria aguda intermitente; PCT: Porfiria cutánea tardía; CPH: Coproporfiria hereditaria; PV: Porfiria variegata. Ferroq.:ferroquelatasa

La Porfiria Aguda Intermitente (PAI), la Coproporfiria Hepática (CPH) y la Porfiria Variegata (PV) se caracterizan por una eliminación urinaria aumentada de ALA y PBG durante la fase aguda, pero difieren en el patrón de porfirinas excretado por orina y heces. La Porfiria Cutánea Tardía (PCT) se diferencia de las otras tres formas por la ausencia de precursores en orina.



### VI.2.2.1. Porfiria cutánea tardía (PCT)

#### - Prevalencia y genética

La PCT es la más común de las porfirias.

Afecta predominantemente al sexo masculino, en proporción 13:1 (Enriquez de Salamanca y col, 1982 a); 12:1 (Topi y D'Alessandro, 1978) u 8:1 (Malina y Chlumsky, 1978). Factores exógenos, endógenos y quizás también raciales (Eales, 1972) ejercen sin duda su influencia sobre la incidencia de la PCT en razón del sexo.

La PCT recibe el nombre de "tardía o tarda" precisamente en virtud de su manifestación tardía. La edad media de aparición se encuentra alrededor de los 49 años según Malina y Chlumsky (1978) y Enriquez de Salamanca y col (1982 a). La PCT puede permanecer latente durante toda la vida del paciente o excepcionalmente manifestarse en la primera infancia (Enriquez de Salamanca y col, 1973; Piñol Aguadé y col, 1973; Laguna y col, 1975; D'Alessandro y Topi, 1978; Cruces y col, 1980).

Aunque es frecuente hallar antecedentes alcohólicos en pacientes con PCT, resulta sumamente difícil establecer la real cuantía e influencia de la ingesta etílica. Aunque se sabe que el alcohol puede alterar transitoriamente la actividad de alguna de las enzimas del camino biosintético del hemo, incluida la decarboxilasa (Mc Coll Kel y col, 1980, 1981; Doss y col, 1981) y provocar el desencadenamiento de la PCT (Doss, 1980), el alcoholismo por sí mismo no sería capaz de inducir una PCT.

Clásicamente, la PCT ha sido considerada como un trastorno adquirido del metabolismo porfirínico y por ello denominada adquirida o sintomática. Tal creencia se basaba fundamentalmente en la ausencia de antecedentes familiares de enfermedad porfírica a partir de la anamnesis del paciente y en el bien reconocido efecto de los diversos factores precipitantes (alcohol, estrógenos, hepatopatía, siderosis,...).

Sin embargo, hoy se acepta que la PCT puede ser también un error congénito del metabolismo del hemo, análogamente a lo que sucede con las demás porfirias. Sin negar la existencia de una variedad tóxica adquirida, se sostiene que la PCT en muchos casos es una enfermedad hereditaria aunque para su manifestación clínica e incluso bioquímica se requiere la interacción con cier

tos factores precipitantes.

La hipoactividad hepática de la decarboxilasa constituye la anomalía primaria de ambas formas de PCT (Kushner y col, 1976; Elder y col, 1978) y de su modelo experimental inducido por hexaclorobenceno (Elder y col, 1976). Si dicha enzimopatía se reflejase también en los eritrocitos, el problema quedaría en gran medida resuelto. Algunos autores han encontrado que la actividad de decarboxilasa eritrocitaria se halla disminuida tanto en los pacientes con PCT como en sus familiares afectados (Kushner y col, 1976; Benedetto y col, 1978; Felsher y col, 1978; Tiepermann y Doss, 1978), sin embargo otros autores no han podido confirmarlo (Blekkenhorst y col, 1976; Elder y col, 1978).

Por lo tanto, se ha propuesto que la PCT es también un trastorno hereditario del metabolismo porfirínico aunque por su baja penetrancia y por las dificultades técnicas y escasa sensibilidad de los diferentes métodos analíticos utilizados no se puede, con frecuencia, identificar a los demás miembros afectados. La incidencia de diversos factores exógenos y endógenos contribuye a la manifestación de la enfermedad, que, a su vez, tanto en el hombre como en los animales de laboratorio, puede ser reproducida mediante la acción de determinados tóxicos.

#### - Naturaleza enzimopatológica

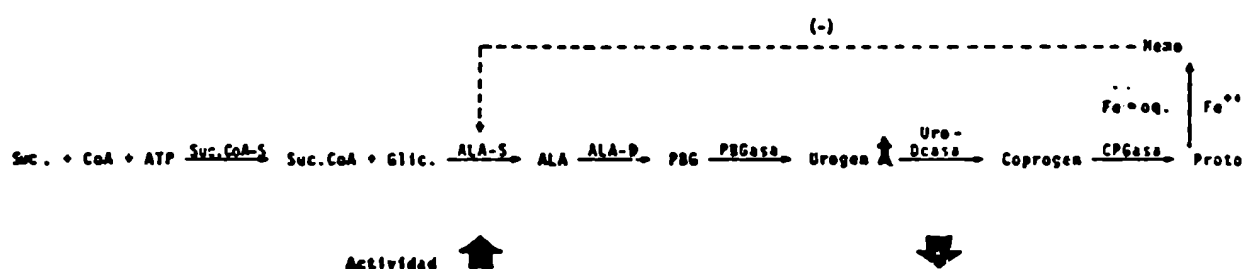
Como ya mencionáramos anteriormente, el defecto patogénico fundamental de la PCT reside en una reducción significativa de la actividad de la decarboxilasa hepática con respecto a los valores normales.

Como consecuencia de esta deficiencia se acumulan y excretan grandes cantidades de las porfirinas más policarboxílicas, fundamentalmente uro y hepta (Dowdle y col, 1970).

Debido a un mecanismo de de-represión, secundario a ese bloqueo parcial primario, o a la acción inductora directa de los diversos factores precipitantes de la PCT, se observa generalmente un aumento de la actividad de la enzima limitante, ALA-S (Moore y col, 1972) (Figura VI.4.).

Además de la enzimopatía de la PCT, también juega un papel patogénico muy importante la alteración de las membranas de las organelas celulares con el consiguiente escape de la uroporfirina del citosol tanto hacia la mitocondria como hacia el es-

pacio intercelular (Koszó y col, 1982). Para Doss (1980) la PCT debe definirse como "enfermedad de membrana" mientras que las porfirias hepáticas agudas han de ser consideradas como "enfermedades de regulación".



**FIGURA VI.4.:** Esquema propuesto para explicar el cuadro bioquímico característico de una porfiria cutánea tarda sintomática. Ferroq.: ferroquelatasa.

#### - Papel del hierro en la PCT

La importancia de la frecuente, aunque moderada, sobrecarga férrica de los pacientes con PCT se ve comprobada por el hecho de que la eliminación del hierro corporal mediante sangrías repetidas constituye un eficaz tratamiento (Ippen, 1977), mientras que la administración de tal metal puede provocar la recaída (Lundvall, 1971; Ivanov y col, 1982). Dado que la actividad hepática de la decarboxilasa no se recupera, aún luego de alcanzar la remisión, en base a una disminución de los depósitos de hierro mediante sangrías repetidas (Elder y col, 1978), Felsher y col (1982) han propuesto que el hierro modula la producción de uroporfirina a través de algún mecanismo no relacionado con la actividad de esta enzima.

#### - Cuadro clínico

La PCT ha sido denominada "hepatocutánea" en virtud de la especial relevancia de los dos signos clínicos básicos (hepático y dermatológico) que la caracterizan.

#### Aspectos dermatológicos:

La hiperfragilidad cutánea ante los más mínimos traumatismos

mos constituye el síntoma más precoz (y en ocasiones único) de la enfermedad, aunque el rasgo más característico es la formación de ampollas, espontáneamente o bien en relación con la exposición solar, con el calor, o con los microtraumatismos.

Las ampollas contienen un líquido serotransparente o serohemorrágico, son frágiles y efímeras, y tras su ruptura dan lugar a erosiones de fondo serohemorrágico que se recubren de una costra y tras cicatrizar suelen dejar una mancha hiperpigmentada. Tales lesiones se originan en las regiones expuestas a la luz y a los traumatismos y por ello se presentan más frecuentemente en dorso de manos.

La hipertrichosis también se aprecia fundamentalmente en las regiones descubiertas y característicamente en la zona temporomalar (Enriquez de Salamanca y col, 1982 a).

#### Hepatopatía de la PCT

La expresividad clínica de la afección hepática en la PCT es en términos generales bastante pobre. Salvo la palpación de una hepatomegalia en algo más del 45% de los casos, la frecuencia de otros signos como esplenomegalia, ictericia subictericia, etc., no alcanza al 8%.

El conjunto de lesiones hepáticas estructurales y ultraestructurales pueden coincidir en grado variable en un mismo paciente, siendo las afecciones más comunes la hepatitis crónica persistente, la hepatitis crónica activa y la cirrosis hepática, aunque con prevalencia muy variable según los distintos autores (Mascaro y col, 1973; Topi y D'Alessandro, 1976; Malina y Chlumsky, 1978; Enriquez de Salamanca y col, 1982 a; Solis y col, 1982).

La severidad de la hepatopatía subyacente parece estar en relación con la edad del paciente o, más probablemente, con el tiempo de evolución de la PCT (Bruguera y col, 1980; Cortes y col, 1980). Ippen (1982) sostiene que la PCT no tratada progresa en el curso de 5-20 años hacia cirrosis hepática descompensada.

#### - Cuadro bioquímico

La tasa de porfirinas eritrocitarias, la excreción urinaria de precursores (ALA y PBG) y la eliminación fecal de protoporfirina, son normales en la PCT. La excreción tanto urinaria

como fecal de coproporfirina se encuentra moderadamente incrementada. El rasgo bioquímico más característico reside en la masiva uroporfirinuria, de manera que si bien fisiológicamente en la orina predomina netamente la coproporfirina (Enriquez de Salamanca y col, 1982 b), en la PCT son, en cambio, mayoritarias las porfirinas altamente carboxiladas (7-COOH y 8-COOH), lógica consecuencia del defecto decarboxilativo.

La determinación de estos parámetros mediante el empleo de técnicas analíticas rutinarias, permite lograr una adecuada evaluación bioquímica de la PCT.

Las porfirinas plasmáticas, hepáticas y en piel, adoptan un perfil similar al urinario, aunque con mayor proporción aún de las más policarboxílicas (Doss y col, 1971; Day y col, 1978; Polo y col, 1983).

#### - Tratamiento

Obviamente la primera medida que debe aplicarse a los pacientes con PCT es la supresión de todo factor precipitante o agravante. La simple abstinencia de alcohol o la suspensión de la medicación estrogénica pueden ser suficientes, en algunos casos, para lograr la remisión de la enfermedad (Enriquez de Salamanca y col, 1982 c).

Los síntomas dérmicos consecutivos a la exposición solar pueden paliarse más o menos eficazmente con una serie de medidas entre las que se incluyen el uso de barreras protectoras tópicas, la administración de carotenoides (de dudosa eficacia) y las normas de sentido común tendientes a evitar la exposición solar directa (Poh-Fitzpatrick, 1982).

Podemos dividir los diversos tratamientos que han sido preconizados para la PCT en tres grupos. En el primero se incluyen los fármacos cuyo mecanismo de acción podría ejercerse, directa o indirectamente, a nivel de la ruta biosintética del hemo. En el segundo grupo se incluye la medicación preferentemente encaminada a la eliminación de porfirinas y en el tercero, la administración de desferroxamina y las flebotomías repetidas, que tienen por objeto disminuir los depósitos corporales de hierro.

#### VI.2.2.2. Porfiria Aguda Intermitente. (PAI)

##### - Prevalencia y genética

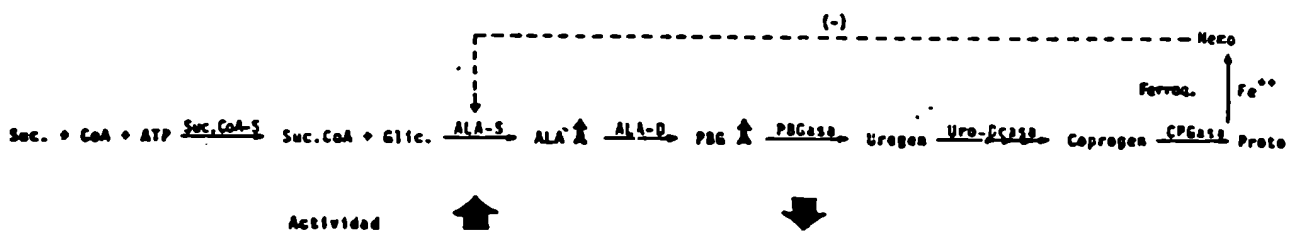
La PAI es una enfermedad hepática del metabolismo del hemo que se transmite con carácter autosómico dominante. Es la única porfiria cuyo síndrome clínico no incluye fotosensibilidad cutánea, ya que la excreción normal de porfirinas no suele estar aumentada. Sus manifestaciones clínicas raramente se presentan antes de la pubertad. Es la más común de las porfirias en Suecia.

##### - Naturaleza enzimopatológica

En esta enfermedad se presentan dos anomalías en el camino del hemo: deficiencia de la deaminasa y elevación del ALA-S, siendo el defecto primario la deficiencia de la deaminasa (Figura VI.5.). Esta disminución ha sido descripta no sólo en el hígado de pacientes con PAI (Strand y col, 1970; Miyagi y col, 1971) sino también en eritrocitos (Meyer y col, 1972; Strand y col, 1972; Magnussen y col, 1974); cultivos de fibroblastos (Meyer, 1973; Sassa y col, 1975 a, b); cultivos de células amnióticas (Sassa y col, 1975 a, b) y linfocitos con mitosis estimulada (Sassa y col, 1978). La deficiencia de deaminasa (aproximadamente 50% del valor normal) ha sido observada invariablemente en estos tejidos tanto en presencia como en ausencia de los síntomas clínicos de PAI, y asociada o no a un incremento de ALA-S. De hecho, el ALA-S sólo se halló aumentada en las células hepáticas durante las crisis agudas de la enfermedad. Estos hallazgos establecen que la deficiencia de deaminasa es el defecto primario hereditario en la PAI, ya que esta deficiencia enzimática caracteriza a todos los portadores, incluyendo a aquellos clínicamente asintomáticos, y el incremento de la actividad de ALA-S es probablemente un fenómeno asociado que puede ser la resultante de diferentes factores contribuyentes.

Se ha postulado que la deficiencia de deaminasa hepática en la PAI lleva a una deficiencia en la formación hepática del hemo, lo cual da como resultado una de-represión de la síntesis de ALA-S (Strand y col, 1970). Estudios posteriores (Sinclair y Granick, 1975; Sassa y Kappas, 1977) con cultivos de células hepáticas de embrión de aves, indicaron que es necesario que las concentraciones de hemo hepático sean considerablemente menores que lo normal para que aumente la síntesis de ALA-S. No queda

claro cómo una disminución del 50% de la deaminasa, que es lo que ocurre en la PAI, puede deprimir la síntesis hepática de hemo tanto como para ocasionar la estimulación secundaria de la producción de ALA-S. Es probable que para que esto ocurra se necesiten otros factores metabólicos tales como: cambios hormonales producidos en el comienzo de la pubertad, variaciones en la producción hormonal durante el ciclo menstrual; exposición a contaminantes ambientales y a una amplia variedad de drogas, cambios en la composición de la dieta y reducida ingestión de calorías (Welland y col, 1964; Tschudy y col, 1964; Kappas y col, 1974; Meyer y Schmid, 1978; Anderson y col, 1979; Tschudy y Lamon, 1980). Entre los factores endógenos que pueden aumentar la susceptibilidad de algunos pacientes con PAI y activar esta enfermedad, se han estudiado particularmente las hormonas esteroideas y sus derivados. Actualmente está claro que un amplio espectro de metabolitos derivados de la biotransformación de hormonas esteroideas o sus precursores son potentes inductores del ALA-S e incrementan la producción de porfirinas en cultivos de células de embrión de aves (Granick, 1966; Granick y Kappas, 1967; Kappas y Granick, 1968; Kappas y col, 1968; Sassa y col, 1979).



**FIGURA VI.5.:** Relación entre la deficiencia de porfobilinogena-sa y el incremento de ALA-S en la porfiria aguda intermitente  
Ferroq.: ferroquelatasa

La acción de los esteroideos inductores del ALA-S hepática es esencialmente análoga a la de las drogas y otros inductores químicos de esta enzima.

Así, los quelantes, tales como el CaMgEDTA, aumentan el poder inductor de los esteroideos; la hemina, en concentración de  $10^{-5}$  M, lo inhibe, y la insulina sola, o insulina con hidrocortisona y triiodotironina ejercen un efecto "permisivo" sobre la

porfirinogénesis inducida por esteroides. Los esteroides son actualmente la única clase de compuestos naturales en el hombre que poseen capacidad de inducir el ALA-S y la síntesis de porfirinas en hígado (Granick y Kappas, 1967; Kappas y Granick, 1968; Sassa y col, 1979) y en células eritroides (Levere y col, 1967; Irving y col, 1976; Singer y col, 1976; Urabe y col, 1979). Por eso, su rol potencial de incrementar la susceptibilidad de los portadores de PAI y provocar la enfermedad clínica es de considerable interés.

Comparando el metabolismo de esteroides usando hormonas radioactivas en sujetos normales, pacientes con PAI clínicamente expresada y sujetos con PAI latente, se ve que en pacientes clínicamente enfermos, la actividad de  $\Delta^4$ -5 $\alpha$  esteroide reductasa está significativamente disminuída (Anderson y col, 1979) y es interesante que este patrón anormal del metabolismo de esteroides distingue la PAI clínicamente manifiesta no sólo de los sujetos normales sino de los portadores latentes. Así, aunque la deficiencia de deaminasa es igual en pacientes con PAI manifiesta y portadores latentes, el primer grupo presenta una anomalía en el metabolismo de esteroides en el hígado, aún en períodos de remisión, lo cual no se observa en el grupo de portadores.

La base de esta deficiencia en  $\Delta^4$ -5 $\alpha$  esteroide reductasa no se conoce; de todas maneras, la incidencia de esta anomalía endócrina puede aumentar la susceptibilidad de los pacientes para la activación de esta enfermedad.

#### - Cuadro clínico

Todos los síntomas están relacionados con los disturbios neurológicos de los cuales los más característicos son aquellos que involucran al sistema nervioso autónomo, por ejemplo, dolor abdominal, vómitos y constipación (Goldberg y Rimington, 1962; Taddeini y Watson, 1968; Tschudy y col, 1975; Meyer y Schmid, 1978; Tschudy y Lamon, 1980).

El dolor abdominal suele ser difuso, con mayor intensidad en el hemiabdomen inferior, de tipo cólico, continuo con exacerbaciones y períodos de calma. El dolor no cede con los analgésicos ni opiáceos.

El enfermo presenta un estado de agitación y desasosiego que puede llegar a simular un neurótico y suele acompañarse de



fiebre irregular y leucocitosis.

Además se encuentra predominancia de fenómenos motores con parálisis o paresias de extremidades y de músculos respiratorios, laríngeos, deglutorios e impotencia funcional. La complicación más importante es la insuficiencia respiratoria (Batlle y col, 1981).

La severidad de las manifestaciones clínicas, la incidencia de los episodios agudos y el comienzo de los ataques en la PAI son muy variables. Además, la gran mayoría de los portadores del desorden genético, o sea aquellos que tienen la deaminasa disminuida en un 50%, pueden permanecer clínicamente asintomáticos durante toda la vida.

Estos hechos indican que distintos factores, tales como la dieta, las drogas y las hormonas, deben ser importantes en la expresión clínica del defecto genético de la PAI.

#### - Cuadro bioquímico

La PAI se caracteriza por la excreción urinaria de grandes cantidades de ALA y PBG.

El PBG es más específico que el ALA para el diagnóstico de las porfirias hepáticas hereditarias, ya que no se encuentra incrementado en otros casos en los cuales el ALA sí lo está, por ejemplo, en la intoxicación con Pb. El PBG urinario puede disminuir durante los períodos de remisión de la PAI, pero raramente llega a valores normales en pacientes que han sufrido episodios agudos. Por otro lado, muchos portadores de PAI y que por lo tanto tienen actividad de deaminasa disminuida en eritrocitos y otras células, no presentan excreción aumentada de PBG en ningún momento de sus vidas y nunca desarrollan síntomas.

La concentración de porfirinas urinarias en pacientes con PAI en remisión no suele estar significativamente aumentada (Cookson y Rimington 1954; Tschudy, 1965; Meyer y Schmid, 1978). Si la orina permanece estacionada, los valores de porfirinas pueden aumentar, a causa de la ciclación espontánea del PBG (Cookson y Rimington, 1954; Watson, 1954), que se ve facilitada por el pH ácido de la orina y por la luz (Cookson y Rimington, 1954). Así, la mayoría de las porfirinas urinarias en la PAI parecen formarse artificialmente, luego de su emisión (Meyer y Schmid, 1978). En concordancia con esto, copro y proto fecales

sólo están levemente aumentadas.

En pacientes con PAI, se ha detectado ALA y PBG en plasma y fluido cerebro-espinal (Sweeney y col, 1970; Bonkowsky y col, 1971).

Actualmente, existen discrepancias sobre el efecto directo que el ALA ejercería en las células del sistema nervioso central.

Cuando se administra ALA intraperitonealmente a ratas se inducen trastornos neurológicos y de conducta (Moore y Meredith, 1976; Pierach y Edwards, 1978). Pero, Pierach y Edwards (1978) concluyen que es improbable que el ALA o el PBG causen los disturbios neurológicos de las porfirias ya que se requieren cantidades relativamente grandes para ocasionar aberraciones neurológicas en las ratas. Además, el principal síntoma en animales son las convulsiones y éstas no son los signos más comunes en pacientes con PAI.

#### - Tratamiento

Las crisis agudas de las porfirias hepáticas hereditarias pueden estar asociadas con la dieta (Knudson y col, 1977) y pueden superarse aumentando la ingestión de carbohidratos o por infusión de grandes cantidades de glucosa (Welland y col, 1964). La eficacia de la glucosa en el tratamiento de las porfirias hepáticas tiene una analogía experimental ("efecto glucosa") en la prevención de la inducción química de la porfiria, ya que la administración de glucosa puede bloquear la inducción del ALA-S (Rose y col, 1961; Tschudy y col, 1964; Marver y col, 1966), aunque el mecanismo exacto de este efecto no se conoce.

Watson y col (1973; 1974; 1977; 1978) aplicaron una terapia específica para las crisis de PAI, utilizando infusiones i.v. de hematina. El empleo de hematina en las porfirias agudas se inició sobre la base de que el ALA-S hepática se induce durante los ataques agudos, y esta inducción estaría sujeta a la represión por producto final, la hemina, hecho comprobado experimentalmente (Granick, 1966; Waxman y col, 1966).

Más recientemente se ha aplicado con éxito una nueva terapia desarrollada en nuestro laboratorio (Wider y col, 1980) que consiste en la administración oral de ácido fólico durante cortos períodos de tiempo.

En todos los pacientes que recibieron fólico, se comprobó una rápida recuperación tanto clínica como bioquímica.

El fundamento de esta terapia se basa en estudios efectuados por Rossetti y col (1981) que determinaron la capacidad activante del ácido fólico sobre las enzimas PBGasa y deaminasa aisladas de cultivos de *Euglena gracilis*.

### VI.2.2.3. Porfiria Variegata (PV)

#### - Prevalencia y genética

La PV es una de las formas agudas hereditarias de las porfirias hepáticas, que se transmite con carácter autosómico dominante.

El cuadro clínico y bioquímico de la PV fue descrito por primera vez en 1937 (van der Bergh y Grotepass, 1937) y desde entonces el número de casos se ha incrementado significativamente (Mustajoki, 1978).

Esta porfiria es llamativamente común entre la población blanca de Sud-Africa (Eales, 1963; Dean, 1971), con una incidencia del 3 % y alrededor de 10.000 pacientes. En el resto del mundo hay referencias de unos 300-500 casos. En nuestro país es difícil determinar la cifra, pero en los últimos seis años, sólo a nuestro centro han llegado más de 10 pacientes claramente diagnosticados como PV.

Las porfirias agudas no se manifiestan clínica o bioquímicamente antes de la pubertad; sin embargo, hay unos pocos casos de PAI y CPH descritos en niños menores de 12 años, y también parece haber excepciones para la PV, referidas por Kramer (1980) en un niño de 5 años quien después de haber sido tratado durante un año con carbamacepina desarrolló los síntomas agudos y cutáneos y otro por Parera y col (1983) en una niña de 4 años.

#### - Naturaleza enzimopatológica

El constante incremento de los niveles de protoporfirina fecal en pacientes con PV indica que el defecto enzimático estaría en la porción terminal del camino del hemo. Podría estar a nivel de la ferroquelatasa, enzima defectiva en la protoporfiria (Bonkowsky y col, 1975; Bottomley y col, 1975). Pero, con excep

ción del elevado nivel de protoporfirina fecal, las manifestaciones clínicas y bioquímicas de la PPE y la PV son muy diferentes.

La otra alternativa era un defecto a nivel de la protoporfirinógeno-oxidasa, lo cual se ha confirmado en el hígado de pacientes con PV (Brenner y Bloomer, 1980) y en otros tejidos por el grupo de Nordmann (Deybach y col, 1981).

Por otro lado, ya en 1967 (Dowdley y col) habían demostrado un aumento secundario de la actividad del ALA-S hepática en PV.

#### - Cuadro clínico

Se incluyen ataques agudos de dolores abdominales, manifestaciones neuropsiquiátricas y/o lesiones fotocutáneas.

La PV tiene características en común con la PCT y la PAI. En algunos pacientes sólo se presentan manifestaciones cutáneas, en otros sólo las agudas y en un tercer grupo, ambos síntomas. El ataque agudo es típicamente intermitente y con frecuencia precipitado por varias drogas y otros factores (Eales, 1971).

#### - Cuadro bioquímico

Los pacientes con PV tienen altos niveles fecales de protoporfirina y una "fracción X porfirina" (Rimington y col, 1968), constituida por un complejo péptido-porfirínico.

En orina, la coproporfirina excede a la uroporfirina, y los niveles de ALA y PBG urinarios están muy incrementados durante los ataques agudos (Eales y col, 1963).

Las porfirinas eritrocitarias son normales en todo momento, lo cual confirma que es el hígado el único responsable del exceso de porfirinas y precursores.

Existen disturbios electrolíticos, hiponatremia (Eales y col, 1971), cambios neuropatológicos (Campbell, 1963) y aún en estado latente, se han descrito evidencias de neuropatía periférica (Mustajoki y Seppäläinen, 1975).

#### VI.2.2.4. Coproporfiria hereditaria (CPH)

##### - Prevalencia y genética

La CPH se presenta en ambos sexos y por lo menos la mitad de los sujetos con CPH son asintomáticos o exhiben sólo síntomas leves (Jaeger y col, 1975). El desorden es claramente hereditario, en forma autosómica dominante, pero la expresión clínica y la severidad son muy variables y la sintomatología heterogénea.

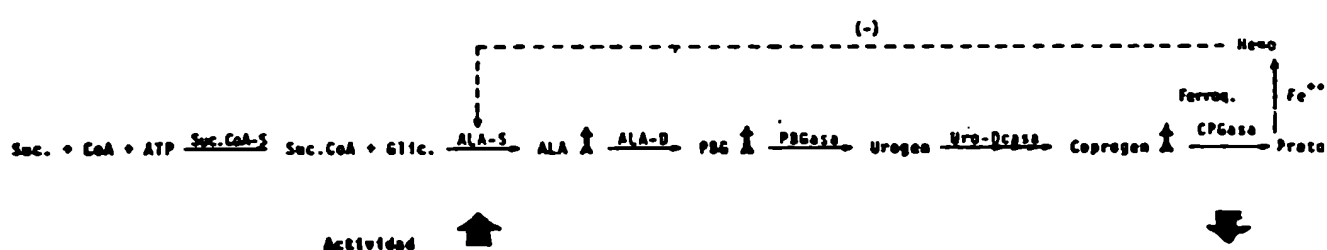
##### - Naturaleza enzimopatológica

En pacientes con CPH manifiesta y en crisis aguda, la actividad de ALA-S hepática está elevada (Sasaki y col, 1969; Kaufman y Marver, 1970; Mc Intyre y col, 1971), sin embargo se encontró que sus valores eran normales cuando el paciente se hallaba en remisión, al tiempo que se normalizaban también ALA y PBG urinarios (Mc Intyre y col, 1971).

Como en los casos de PAI, el patrón de excreción de porfirinas sugiere que la elevada actividad de ALA-S hepática puede ser un fenómeno secundario asociado al defecto enzimático primario que afectaría el paso de coprogen a protogen, o sea a la coprogenasa (CPGasa) (Figura VI.6.). La medición directa de esta enzima en tejidos de pacientes con CPH confirmó su deficiencia. Dado que la CPGasa es una enzima mitocondrial, su ensayo no puede llevarse a cabo en eritrocitos. Elder y col (1976) determinaron CPGasa en cultivos de fibroblastos de piel de 3 pacientes con CPH, pertenecientes a dos familias y encontraron que la actividad enzimática era aproximadamente la mitad que la de los individuos normales o pacientes con otros tipos de porfiria. Nordmann y col (1977) y Grandchamps y Nordmann (1977), también observaron una deficiencia de la CPGasa en linfocitos de 17 individuos con CPH. Tanto los pacientes como los portadores (sin síntomas clínicos pero con altos niveles de copro fecal) tenían aproximadamente la mitad de la actividad enzimática de los controles. Esta deficiencia también se demostró en leucocitos de pacientes con CPH (Brodie y col, 1977). Estos datos confirmaron la hipótesis de que el defecto genético primario en la CPH es una falla a nivel de la CPGasa.

De acuerdo con Elder y col (1976) una CPGasa disminuida un 50% en CPH está todavía en un exceso de aproximadamente 30

veces con respecto a la deaminasa hepática (Strand y col, 1970). Esta actividad normalmente baja de deaminasa puede explicar la excesiva excreción de ALA y PBG durante los ataques agudos de CPH; de esta manera, las crisis en CPH pueden considerarse, como en PAI, consecuencia del carácter limitante de la deaminasa cuando el ALA-S está inducida. Esta condición es probablemente más difícil de alcanzar en CPH que en PAI, porque en el primer caso la actividad de deaminasa es normal, mientras que en el segundo está disminuída un 50%. Este hecho quizás explique también el mayor porcentaje de casos latentes en CPH comparado con PAI, en varias familias estudiadas (Goldberg y col, 1967; Lomholty With, 1969; Strand y col, 1972; Brodie y col, 1977).



**FIGURA VI.6.:** Relación entre la deficiencia de coproporfirino-genasa y el incremento de ALA-S en coproporfiria hereditaria  
Ferroq.: ferroquelatasa.

#### - Cuadro clínico

La CPH es similar a la PAI y a la PV ya que su sintomatología clínica es esencialmente neurovisceral. Pero, a diferencia de los pacientes con PAI, en la CPH puede presentarse también fotosensibilidad cutánea. Se sabe que los ataques agudos de CPH pueden provocarse por los mismos compuestos que precipitan los ataques agudos de PAI o PV.

Los síntomas y signos más frecuentemente hallados son: dolor abdominal (80%), vómitos (34%), fotosensibilidad (29%), síntomas neurológicos y psiquiátricos (23%) y constipación severa (20%) (Brodie y col, 1977). Aparentemente, el desorden es menos severo que en PAI, ya que se han reportado sólo 2 casos fatales, debido ambos a insuficiencia respiratoria (Brodie y col, 1977). Como en PAI, los ataques agudos tienen preponderancia femenina (5:2). En el 54% de las crisis los factores preci-

pitantes fueron drogas o productos químicos y los barbituratos fueron responsables del 34% de los casos (Brodie y col, 1977).

#### - Cuadro bioquímico

En la CPH clínicamente manifiesta predomina una excesiva excreción urinaria de copro III. En algunos pacientes, más del 95% de las porfirinas urinarias es copro, mientras que en otros están incrementadas tanto uro como copro (uro << copro) además de menores proporciones de hepta, hexa y pentaporfirina.

Las heces contienen grandes cantidades de copro, acompañada de menores aumentos de porfirinas más carboxiladas. Aproximadamente el 15% de la copro fecal está quelada con cobre, probablemente por una incorporación no enzimática del metal en la porfirina (Carlson y col, 1978).

También puede estar incrementada la proto fecal, pero siempre menos que copro. Durante los ataques agudos, las concentraciones de ALA, PBG y copro urinarias se elevan marcadamente.

Tanto en la CPH como en PV, en remisión se normalizan los niveles de precursores, a diferencia de lo que ocurre en la PAI.

#### VI.2.2.5. Porfiria aguda de Doss

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

La actividad del ALA-D eritrocitaria 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 de porfiria hepática aguda hereditaria con manifestacio

nes intermitentes, clínicamente análoga a la PAI.

### VI.2.3. Porfiria Hepatoeritrocitaria

Esta denominación fue originariamente propuesta por Piñol Aguadé y col (1975) a raíz de un caso en el cual encontraron características correspondientes a la PCT, y además, protoporfirina aumentada en glóbulos rojos.

Una sugerencia interesante de Elder y col (1972) es que esta condición es de hecho una forma homocigótica de la PCT familiar, opinión compartida por Eriksen y Seip (1973) quienes además sugirieron que podría tratarse de un tipo de porfiria hepática, como la PV, pero producida por un gen raro y único de transmisión dominante, aunque de muy baja penetrancia. Aún no se ha llegado a un acuerdo al respecto.

Clínicamente, el cuadro es difícil de distinguir de un caso severo de PCT o de PCE. La excreción urinaria y fecal de porfirinas se asemeja al de la PCT, pero en glóbulos rojos la protoporfirina es la única porfirina que está aumentada. En las porfirinas acumuladas y excretadas predomina el tipo isomérico III.

### VI.2.4. Porfirinurias

#### VI.2.4.1. Intoxicación por Pb

La intoxicación por Pb ha sido reconocida como la causa de una porfirinuria desde fines del siglo XIX (Goldberg, 1968).

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 sólo constituye una amenaza para quienes tienen contacto directo con el mismo, sino también, en forma accidental, para los usuarios y los familiares de las personas expuestas.

Existen dos vías de ingreso de los compuestos de plomo inorgánicos en el cuerpo humano:



- a) Por el tracto respiratorio, a través de la inhalación de vapor, humo, niebla o polvo;
- b) por el tracto digestivo, por ingestión de compuestos de Pb atrapados en la parte superior del tracto respiratorio o introducidos en la boca con la comida, cigarrillos, herramientas, dedos y otros objetos. No penetra por la piel (Calabrese y Astolfi, 1980).

- Cuadro clínico

Los síntomas se pueden agrupar en cuatro grandes síndromes, de acuerdo con el tropismo del plomo (Calabrese y Astolfi, 1980):

- a) Síndrome neuropsiquiátrico: irritabilidad, vómitos, convulsiones, coma, paresias y parálisis, cefaleas persistentes, psicopatías diversas, impotencia sexual, frigidez, astenia, insomnio, neuritis óptica, etc.
- b) Síndrome gastrointestinal: constipación persistente, cólicos abdominales, dolores espasmódicos difusos, ribete gingival y yugal, disgeusias, dispepsias, inapetencia, síndrome pseudo-ulceroso.
- c) Síndrome hematológico: anemia microcítica hipocrómica, punteado basófilo en GR.
- d) Síndrome urinario: glucosuria, aminoaciduria (ALA, glicina), coproporfirinuria.

- Disturbios en el metabolismo del hemo

A nivel del metabolismo celular, el Pb actúa inhibiendo las enzimas sulfhidríticas, que dependen de la presencia de grupos -SH para su actividad. 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 sulfhidríticas y por ende, sensibles al Pb, las etapas sobre las cuales el metal ejerce mayor acción son las que llevan a la formación del PBG, la conversión de coproporfirinógeno III a protoporfirina IX y la quelación de ésta con el Fe (Kreimer-Birnbaum y Grinstein, 1965) (Figura VI.7.).

Como consecuencia de estos desórdenes metabólicos, la in

toxicación por Pb se manifiesta bioquímicamente por una excreción aumentada de ALA y Coproporfirina III en orina y un exceso de protoporfirina IX quelada con Zn (Zn-PP) en GR. La presencia de estos compuestos es de alto valor para el diagnóstico.

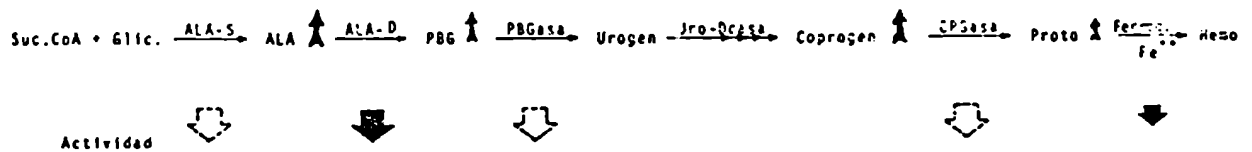


FIGURA VI.7.: Efecto del plomo sobre la actividad de distintas enzimas del camino del hemo. Inhibición demostrada (flechas sólidas) y postulada (flechas punteadas). Ferroq.: ferroquelatasa.

La actividad del ALA-D se encuentra significativamente disminuída en GR (80-100%), existiendo una correlación lineal entre el logaritmo de la actividad del ALA-D eritrocitaria o el contenido de ALA en orina y la concentración de Pb en sangre (Wada, 1976).

#### - Tratamiento

El Pb es un tóxico acumulativo, que se libera a muy baja velocidad y sólo cuando ha cesado la exposición. Por ello, los síntomas clínicos y bioquímicos disminuyen espontáneamente sólo en forma muy lenta.

El método de detoxificación usado es la terapia con quelantes. Los complejos metal-quelantes son solubles en agua y se excretan rápidamente por vía renal. Por el momento, sólo el  $\text{CaNa}_2\text{-EDTA}$ , la D-penicilamina y el BAL (en niños) 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 entonces una serie de efectos colaterales, a causa de su interacción con elementos fisiológicamente esenciales que se encuentran presentes en el organismo en bajas concentraciones o trazas. Estos efectos indeseados pueden evitarse, compensando la disminución de los biometales por administración exógena de los mismos.

Un tratamiento que está prácticamente libre de efectos colaterales es la terapia por reemplazo enzimático. Recientemente se aplicó con éxito esta nueva técnica en un caso de intoxicación crónica por Pb, utilizando fantasmas de eritrocitos del propio paciente cargados con la enzima ALA-D purificada a partir de sangre de donadores normales. La rápida recuperación clínica y bioquímica del paciente, indicaron que este nuevo tratamiento puede resultar beneficioso para un gran número de intoxicados con Pb (Batlle y col, 1983).

## REFERENCIAS

- Anderson, K.E.; Bradlow, H.L.; Sassa, S. & Kappas, A. (1979) Am. J. Med. 66, 544.
- Batlle, A.M. del C.; Magnin, H.P. & Wider, E.A. (1981) en "Porfirinas y Porfirias: etiopatogenia, clínica y tratamiento" EUDEBA. Buenos Aires, p.87.
- Batlle, A.M. del C.; Bustos, N.; Stella, A.M.; Wider, E.A.; Conti, H. & Mendez, A. (1983) Int. J. Biochem. 15, 1261.
- Benedetto, A.V.; Kushner, J.P. & Taylor, J.S. (1978) N. Engl. J. Med. 298, 358.
- Bhutani, L.K. (1982) No-publicado
- Bhutani, L.K.; Sood, S.K.; Das, P.K. (1974) Arch. Derm. 110, 427.
- Blekkenhorst, G.; Pimstone, N.R. & Eales, L. (1976) en "Porphyrins in Human Diseases" (Ed. M.Doss), Karger, Basilea, p.299.
- Bonkowsky, H.L.; Tschudy, D.P.; Collins, A.; Doherty, J.; Bossenmaier, L.; Cardinal, R. & Watson, C.J. (1971). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 2725.
- Bonkowsky, H.L.; Bloomer, J.R.; Ebert, P.S. & Mahoney, M.J. (1975) J.Clin. Invest. 56, 1139.
- Bottomley, S.S.; Tanaka, M. & Everett, M.A. (1975) J. Lab. Clin. Med. 86, 126.
- Brenner, D.A. & Bloomer, J.R. (1980) N. Engl. J. Med. 302, 765.
- Brodie, M.J.; Thompson, G.G.; Moore, M.R.; Beattie, A.D. & Goldberg, A. (1977) Quart. J. Med. 46, 229.
- Bruguera, M.; Herrero, C.; Mascaro, J.M. & Rodes, J. (1980) Rev. Esp. Enf. Ap. Digest. 58, 325.
- Calabrese, E.J. & Astolfi, M. (1980) en "Toxicología". (Ed. Kapelusz) p. 131.
- Campbell, J.H.A. (1963) S. Afr. J. Lab. Clin. Med. 9, 197.
- Carlson, R.E.; Dolphin, D. & Bernstein, M. (1978) Clin. Chem. 24, 2009.
- Cookson, G.H. & Rimington, C. (1954) Biochem. J. 57, 476.

- Cortes, J.M.; Oliva, H.; Paradinas, F.J. & Hernández-Guio, C. (1980) *Histopathology* 4, 471.
- Cruces, M.J.; Enriquez de Salamanca, R.; Vereza, M.; Peña, M. L.; Catalan, T. & Robledo, A. (1980) *Dermatologica* 161, 205.
- Chatterji, A.K.; Ghosh, S.K. & Chatterjea, J.B. (1963) *J. Ass. Phys. India* 11, 937.
- D'Alessandro Gandolfo, L. & Topi, G.C. (1978) en "Diagnosis and Therapy of Porphyrrias and Lead Intoxication" (Ed. M.Doss) Springer-Verlag, Berlín, p. 139.
- Darocha, T.; Weremowicz, J. & Gregor, A. (1971) *Journ. Lab. Clin. Med.* 17, 231.
- Day, R.S.; Pimstone, N.R. & Eales, L. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 897.
- Dean, G. (1971) en "The Porphyrrias. A story of inheritance and environment" 2nd. Ed. London. Pitman Medical Publishing Co.
- Deybach, J.Ch.; de Verneuil, H. & Nordmann, Y. (1981) *Hum. Genet.* 58, 425.
- Doss, M. (1978) *International Symposium Clinical Biochemistry.* Springer-Verlag. Berlin Heildelberg, N. York.
- Doss, M. (1980) *Klin. Wochenschr* 58, 141.
- Doss, M.; Look, D.; Henning, H.; Luders, C.J.; Dolle, W. & Strohmeyer, G. (1971) *Klin. Chem. Klin. Biochem.* 9, 471.
- Doss, M.; von Tiepermann, R. & Schneider, J. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 823.
- Doss, M.; von Tiepermann, R.; Stutz, G. & Teschke, R. (1981) *Enzyme* 26, 24.
- Dowdle, E.B.; Mustard, P. & Eales, L. (1967) *S.Afr. Med.J.* 41, 1093
- Dowdle, E.B.; Goldwain, P.; Spong, N. & Eales, L. (1970) *Clin. Sci.* 39, 147.
- Eales, L. (1963) *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.* 9, 151.
- Eales, L. (1971) *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.* 17, 120.
- Eales, L. (1972) en "Essays on Tropical Dermatology" (Ed. J. Marshall) *Excerpta Medica*, Amsterdam, 2, p. 129.
- Eales, L.; Dowdle, E.B.; Saunders, J. & Sweeney, G.D. (1963) *S. Afr. Med. J.* 37, 100.

- Eales, L; Dowdle, E.B. & Sweeney, G.D. (1971) S. Afr. J. Lab. Clin. Med. 9, 197.
- Elder, G.H.; Gray, C.H. & Nicholson, D.C. (1972) J. Clin. Pathol. 25, 1013.
- Elder, G.H.; Evans, J.O. & Matlin, S.A. (1976) Clin. Sci. Mol. Med. 51, 71.
- Elder, G.H.; Lee, G.B. & Tovey, J.A. (1978) N. Engl. J. Med. 299, 274.
- Enriquez de Salamanca, R.; Nuñez, M.; Sanz, C. & Catalán, T. (1973) Med. Cut. 7, 69.
- Enriquez de Salamanca, R.; Chinarro, S.; Valls, V.; Muñoz, J.J.; Perpiñá, J.; Berges, L.; Pascual, R. & Olmos, A. (1982 a) En docrinología Clínica y Metabolismo 4, año 1, 46.
- Enriquez de Salamanca, R.; Peña, M.L.; Chinarro, S.; Olmos, A.; Mingo, D.; Molina, C. & Muñoz, J.J. (1982 b) Int. J. Biochem. 14, 251.
- Enriquez de Salamanca, R.; Mingo, D.; Chinarro, S.; Muñoz, J. J. & Perpiñá, J. (1982 c) Arch. Dermatol. Res. 274, 179.
- Eriksen, L. & Seip, M. (1973) Clin. Genet. 4, 166.
- Felsher, B.F.; Norris, M.E. & Shih, J.C. (1978) N. Engl. J. Med. 299, 1095.
- Felsher, B.F.; Carpio, N.M.; Engleking, D.W. & Nunn, A.T. (1982) N. Engl. J. Med. 306, 766.
- Gidari, A.S. & Levere, R.D. (1977) Semin. Hematol. 14, 145.
- Goldberg, A. (1968) Semin. Hematol. 5, 424.
- Goldberg, A. & Rimington, C. (1962) en "Diseases of Porphyrin metabolism" (Ed. Charles C. Thomas) Springfield, Ill.
- Goldberg, A.; Rimington, C. & Lochhead, A. (1967) Lancet i: 632.
- Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 74, 1089.
- Granick, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 1359.
- Granick, S. & Kappas, A. (1967) J. Biol. Chem. 242, 4587.
- Günther, H. (1911) Deutsches. Arch. f. Klin. Med. 105, 89.
- Günther, H. (1922) Allgem. Path. u. Pathologischen Anat. 20, 608

- Haeger-Arönsen, B. (1963) Amer.J. Med. 35, 450.
- Heilmeyer, L. & Clotten, R. (1964) German Med. Monthly 9, 353.
- Heilmeyer, L.; Clotten, R.; Kerp, L.; Merker, H.; Parra, C.A. & Wezel, H. (1963) Deuts. Med. Wochsft 88, 2449.
- Heilmeyer, L.; Clotten, R. & Heilmeyer, L. Jr. (1966) en "Disturbances in Heme Synthesis" (Ed. Charles C. Thomas) Springfield, Ill.
- Ippen, H. (1977) Semin. Hematol. 14, 253.
- Ippen, H. (1982) en "Symposium of Porphyrias" (Eds. J.M. Mascaró, T. Miura y P. Santoiani), Garsi S.A., Madrid, p. 55.
- Ippen, H. & Fuchs, T. (1980) Clinics in Haem. 9, 323.
- Irving, R.A.; Mainwaring, W.I.P. & Spooner, P.M. (1976) Biochem. J. 154, 81.
- Ivanov, E.; Adjarov, D.; Kerimova, M. & Naidenova, E. (1982) Dermatologica 164, 127.
- Jaeger, A.; Tempe, J.D.; Geisler, F.; Nordmann, Y. & Mantz, J. M. (1975) Nouv. Presse Med. 4, 2783.
- Kappas, A. & Granick, S. (1968) J. Biol. Chem. 243, 346.
- Kappas, A.; Song, C.S.; Levere, R.D.; Sachson, R.A. & Granick, S. (1968) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 61, 509.
- Kappas, A.; Sassa, S.; Granick, S. & Bradlow, H.L. (1974) en "Brain Dysfunction in Metabolic Disorders" (Ed. F. Plum.) Res. Publ. Assoc. Nerv. Ment. Dis. 53, 225.
- Kaufman, K. & Marver, H.S. (1970) N. Engl. J. Med. 283, 954.
- Knudson, K.B.; Sparberg, M. & Lecocq, F. (1977) N. Engl. J. Med. 277, 350.
- Kosenow, W. & Treibs, A. (1953) Z. Kinderheilkunde 73, 82.
- Koszóc, F.; Horvath, L.I.; Simon, N.; Siklosi, C.S. & Kiss, M. (1982) Biochem. Pharmacol. 31, 11.
- Kramer, S. (1980) Clin. Hematol. 9, 303.
- Kreimer-Birnbaum, M. & Grinstein, M. (1965) Biochim. Biophys. Acta 111, 110.
- Kushner, J.P.; Barbuto, A.J. & Lee, G.R. (1976) J. Clin. Invest. 58, 1089.

- Laguna, C.; Velasco, J.; Enriquez de Salamanca, R.; Reverté, F.; España, M.; Catalán, T. & Mas, V. (1975) Bol. Cat. Pediat. Madrid 18, 3.
- Langhoff, H.; Müller, H. & Rietschel, L. (1961) Arch. f. Clin. u. Exper. Derm. 212, 506.
- Levere, R.D.; Kappas, A. & Granick, S. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 985.
- Levin, E.Y. (1975) Ann.N. Y. Ac. Sc. 244, 481.
- Lomholt, J.C. & With, T.K. (1969) Acta Med. Scand. 186, 83.
- Lundvall, O. (1971) Acta Med. Scand. 189, 51.
- Magnus, I.A. (1982) Endocrinología, Clínica y Metabolismo 4, 32.
- Magnus, I.A.; Jarrett, A.; Prankerd, T.A.J. & Rimington, C. (1961) Lancet *ii*, 448.
- Magnussen, C.R.; Levine, J.B.; Doherty, J.M.; Cheeseman, J.O. & Tschudy, D.P. (1974) Blood 44, 857.
- Malina, L. & Chlumsky, J. (1978) en "Diagnosis and Therapy of Porphyrrias and lead intoxication" (Ed. M. Doss) Springer, Verlag, Berlin, p.117.
- Marver, H.S. ; Collins, A.; Tschudy, D.P. & Rechcigl, M. Jr. (1966) J. Biol. Chem. 241, 4323.
- Mascaro, J.M.; Piñol Aguadé, J.; Bruguera, M. & Galy-Mascaro, C. (1973) Actas Derm. Sif. 64, 177.
- Mc Coll Kel; Thompson, C.G.; Moore, M.R. & Goldberg, A. (1980) Eur. J. Clin. Invest. 10, 107.
- Mc Coll Kel; Moore, M.R.; Thompson, C.G. & Goldberg, A. (1981) Eur. J. Clin. Invest. 11, 461.
- Mc Intyre, N.; Pearson, A.J.G.; Allan, D.J.; Craske, S.; West, G.M.L.; Moore, M.; Beattie, A.D.; Paxton, J. & Goldberg, A. (1971) Lancet *i*, 560.
- Meyer, U.A. (1973) Enzyme 16, 336.
- Meyer, U.A. & Schmid, R. (1978) en "The Metabolic Basis of Inherited Diseases" 5th. Edn. (Eds. J.B. Berglund, J.B. Wyngaarden & D.S. Frederickson) Mc Graw - Hill, New York, p. 1166.
- Meyer, U.A.; Strand, L.J.; Doss, M.; Rees, A.C. & Marver, H. S. (1972) N.Engl. J. Med. 286, 1277.



- Miyagi, K.; Cardinal, R.; Bassenmaier, L. & Watson, C.J. (1971) J. Lab. Clin. Med. 78, 683.
- Moore, M.R. & Meredith, P.A. (1976) en "Trace Substances in Environmental Health" N. A. S mposium (Ed. D.D. Hemphil) University of Missouri, Columbia, p. 363.
- Moore, M.R.; Barnardo, D.; Magnus, I.A.; Turnbull, A.L.; Beattie, A.D. & Goldberg, A. (1972) Lancet ii, 97.
- Moore, M.R.; Thompson, G.G.; Goldberg, A.; Ippen, H.; Seubert, A. & Seubert, S. (1978) J. Biochem. 9, 933.
- Mustajoki, P. (1978) Ann. Int. Med. 89, 238.
- Mustajoki, P. & Seppäläinen, A.M. (1975) Br. Med. J. 2, 310.
- Nordmann, Y.; Grandchamp, B.; Phung, N.; de Verneuil, H.; Grellet, M. & Noire, J. (1977) Lancet i, 140.
- Pain, R.W.; Welch, F.W.; Woodroffe, A.J.; Handley, D.A. & Lockwood, W.L. (1975) Brit. Med. J. iii, 621.
- Parera, V.E.; Afonso, S.G.; Navone, N.; Stelia, A.M.; Batlle, A.M. del C.; Aguilar, P.; Méndez, L.; Castagno, J. & Gianantonio, C. A. (1983) Rev. Arg. Dermatol. En prensa.
- Perderson, R.S. (1978) Scand. J. Urol. Nephrol. 12, 189.
- Pierach, C.A. & Edwards, P.S. (1978) Exp. Neurol. 62, 810.
- Piñol Aguadé, J.; Lecha, M.; Almeida, J.; Herrero, C. & Galy Mascaró, C. (1973) Med. Cut. 7, 45.
- Piñol Aguadé, J.; Herrero, C.; Almeida, J.; Castells Mas, A.; Ferrando, J.; Asprer, J. de; Palov, A. & Gimenez, A. (1975) Ann. Derm. Syph. 102, 129.
- Piomelli, S.; Lamola, A.; Poh-Fitzpatrick, M.B.; Seaman, C. & Harber, L.C. (1975) J. Clin. Invest. 6, 1519.
- Poh-Fitzpatrick, M.B. (1982) Seminars in Liver Disease 2, 164.
- Polo, C.; Stella, A. M.; Wider, E.A.; Batlle, A.M. del C.; Lenczner, M.; Altuna, L. & Magnin, P.H. (1983) Prensa Médica 70, 433.
- Rimington, C.; Lockwood, W.H. & Belcher, R.V. (1968) Clin. Sci. 35, 211.
- Romeo, G. & Levin, E.Y. (1969) Proc. Nat. Ac. Sc. USA 63,
- Rose, J.A.; Hellman, E.S. & Tschudy, D.P. (1961) Metabol 10, 514.

- Rossetti, M.V.; Geralnik, A.A. J. de & Batlle, A.M. del C. (1981) *Int. J. Biochem.* 13, 343.
- Sasaki, H.; Kaneko, K. & Tsuneyama, H. (1969) *Acta Med. Biol. (Niigata)* 17, 97.
- Sassa, S. & Kappas, A. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2428.
- Sassa, S.; Granick, S. & Kappas, A. (1975 a) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 244, 419.
- Sassa, S.; Solish, G.; Levere, R.D. & Kappas, A. (1975 b) *J. Exp. Med.* 142, 722.
- Sassa, S.; Zalar, G.L. & Kappas, A. (1978) *J. Clin. Invest.* 61, 499.
- Sassa, S.; Bradlow, H.L. & Kappas, A. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 10011.
- Schmid, R.; Schwartz, S. & Watson, C.J. (1954) *AMA. Arch. Int. Med.* 93, 167.
- Schwartz, S.; Johnson, J.A.; Stephenson, B.D.; Anderson, A.S.; Edmonson, P.R. & Fussaro, R.M. (1971) *J. Lab. Clin. Med.* 78, 411.
- Sinclair, P. & Granick, S. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 244, 509.
- Singer, J.W.; Samuels, A.L. & Adamson, J.W. (1976) *J. Cell. Physiol.* 88, 127.
- Solis, J.A.; Betancor, P.; Campos, R.; Enriquez de Salamanca, R.; Rojo, P.; Marin, I. & Schuller, A. (1982) *J. Dermatol.* 9, 131.
- Strand, L.J.; Felsher, B.; Redeker, A.G. & Marver, H.S. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1315.
- Strand, L.J.; Meyer, U.A.; Felsher, B.F.; Redeker, A.G. & Marver, H.S. (1972) *J. Clin. Invest.* 51, 2530.
- Sweeney, V.P.; Pathak, M.A. & Asbury, A.K. (1970) *Brain* 93, 369.
- Taddeini, L. & Watson, C.J. (1968) *Semin. Hematol.* 5, 335.
- Tschudy, D.P. (1965) *J. Am. Med. Assoc.* 191, 718.
- Tschudy, D.P.; & Lamon, J.M. (1980) en "Metabolic Control and Disease" 2<sup>nd</sup> Edn. (Eds. P.K. Bondy and L.E. Rosenberg) W B Saunders Philadelphia, p. 939.

- Tschudy, D.P.; Welland, F.H.; Collins, A. & Hunter, G. Jr. (1964) *Metabolism* 13, 396.
- Tschudy, D.P.; Valsamis, M. & Magnussen, C.R. (1975) *Ann. Intern. Med.* 83, 851.
- Tiepermann, R.V. & Doss, M. (1978) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 16, 513.
- Topi, G.C. & D'Alessandro Gandolfo, L. (1976) en "Porphyrins Human Diseases" (Ed. M. Doss) Karger, Basilea, p. 312.
- Topi, G.C. & D'Alessandro Gandolfo, L. (1978) en "Diagnosis Therapy of Porphyrins and Lead Intoxication" (Ed. M. Doss) Springer-Verlag, Berlin, p. 107.
- Urabe, A.; Sassa, S. & Kappas, A. (1979) *J. Exp. Med.* 149, 1314.
- Van der Bergh, A.A.H. & Grotepass, W. (1937) *Wien. Klin. Wochenschr.* 50, 830.
- Wada, O. (1976) *Arch. Environ. Health* 31, 211.
- Watson, C.J. (1954) *Arch. Intern. Med.* 93, 643.
- Watson, C.J.; Dhar, G.J.; Bossenmaier, L.; Cardinal, R. & Petryka, Z.J. (1973) *Ann. Int. Med.* 74, 80.
- Watson, C.J.; Bossenmaier, L.; Cardinal, R. & Petryka, Z.J. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 278.
- Watson, C.J.; Pierach, C.A.; Bossenmaier, L. & Cardinal, R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2118.
- Watson, C.J.; Pierach, C.A.; Bossenmaier, L. & Cardinal, R. (1978) *Adv. Intern. Med.* 23, 265.
- Waxman, A.D.; Collins, A. & Tschudy, D.P. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 675.
- Welland, F.H.; Heilman, E.S.; Gaddis, E.M.; Collins, A.; Hunter, G.W. Jr. & Tschudy, D.P. (1964) *Metabolism* 13, 232.
- Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M. & Malamud, S. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 819.

## CAPITULO VII

### SISTEMAS ENZIMATICOS EMPLEADOS

---

	Página
VII.1. Callos de soya	209
VII.1.1. Tejidos vegetales	209
VII.1.1.1. Cultivo de tejidos	210
VII.1.1.2. Hormonas vegetales	210
VII.1.1.3. Inducción y crecimiento del callo	212
VII.2. Bacterias fotosintéticas	212
VII.2.1. Aspectos generales	212
VII.2.1.1. Clasificación	213
VII.2.1.2. <i>Rhodopseudomonas</i>	213
VII.2.1.21 <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	214
VII.2.1.22 <i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	215
VII.3. Matrices artificiales en el estudio de reacciones bioquímicas	216
VII.3.1. Aspectos generales	216
VII.3.1.1. Condiciones para el acople	219
VII.3.1.11 Reacciones específicas de acople..Activación de <i>Sepharosa</i> con bromocianógeno	220
Referencias	222

## VII. SISTEMAS ENZIMATICOS EMPLEADOS

### VII.1. CALLOS DE SOYA

#### VII.1.1. Tejidos vegetales

Las células de las plantas superiores al igual que las células animales, se encuentran organizadas y diferenciadas en tejidos.

Existen cuatro tipos de tejidos vegetales importantes: meristemático, protector, fundamental y conductor.

En cuanto al tipo de células que constituyen estos tejidos se las pueden dividir en dos grupos; el primero comprende células perfectamente diferenciadas que realizan una función de terminada y que tienen una forma definida; este tipo de células se encuentra en los tejidos protector, fundamental y conductor. Al segundo grupo pertenecen los tejidos formados por células jóvenes capaces de multiplicarse rápidamente y transformarse, según las necesidades, en células del tipo requerido (tejido meristemático o de crecimiento).

Los tejidos meristemáticos se encuentran en las partes del vegetal que crecen rápidamente tales como embriones, yemas o brotes y en la zona generadora o de cambio del tallo y de la raíz. El meristema del extremo de raíces y tallos se denomina apical y su función es aumentar la longitud de los mismos, mientras que el meristema del cambium o lateral es el responsable del aumento del diámetro. Este tipo de tejido es el encargado del crecimiento y además, de la división y diferenciación para dar origen a otro tipo de tejidos.

#### - Tejido de callos de soya

Se denomina "callo" al tejido meristemático, de alta división celular, obtenido a partir del cotiledón de la semilla de soya.

Miller (1963) lo describió como una especie de tejido tumoral de gran utilidad para la detección de sistemas activos.

#### VII.1.1.1. Cultivo de tejidos

Los cultivos de tejidos se obtienen por transferencia de las células o tejidos aislados de su medio normal a un medio que sólo es suficiente para sobrevivir.

Estos sistemas permiten estudiar las respuestas a distintas variaciones provocadas en el medio ambiente en que se desarrollan; en base a estas experiencias es posible luego postular el comportamiento de la célula en su medio normal ante iguales estímulos.

Para que un tejido se desarrolle es necesario colocarlo en un medio nutriente que contenga sales, hidratos de carbono, vitaminas y otras sustancias necesarias para crecer.

En este medio mínimo las células se multiplican, pero no se diferencian en raíces, hojas o tallos. Se produce generalmente una masa sin forma que puede hacerse crecer en esas condiciones por largo tiempo. Esa masa puede a su vez subcultivarse o repicarse en gran número de cultivos idénticos. A medida que aumenta el número de subcultivos sucesivos de un tejido, éste va perdiendo en forma progresiva su capacidad para diferenciarse y también se van modificando varias de sus propiedades.

Una aplicación importantísima de los cultivos de tejidos es su utilización en el estudio del cáncer.

Las plantas desarrollan varias clases de tumores.

#### VII.1.1.2. Hormonas Vegetales

Las hormonas vegetales son compuestos orgánicos que actúan en cantidades muy pequeñas sobre el metabolismo celular y el crecimiento. No existen en el vegetal órganos de secreción interna especializados en la formación de hormonas. Estas se originan principalmente en tejidos no diferenciados como el meristema apical.

Las hormonas tienen variadas acciones según el órgano sobre el que ejercen sus efectos. Actúan en forma sinérgica, y por lo tanto la acción de cada una de ellas es influenciada por la presencia de las otras.

Las investigaciones de Fritlandt en Holanda (1926) per

mitieron descubrir en semilla de avena, la existencia de un tipo de sustancia difusible, denominada auxina, que activaba el crecimiento de las plantas.

Dentro de las auxinas, la más conocida que participa principalmente en los fenómenos de crecimiento de las plantas es el ácido 3-indolacético (IAA), también llamado heteroauxina. Este compuesto, agregado a un medio nutriente, promueve la división celular y da lugar a un crecimiento continuo. Se origina en los meristemas y su concentración es muy pequeña en los tejidos en crecimiento (5 - 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Esto se debe a que se destruye continuamente por acción de la enzima específica ácido 3-indolacético oxidasa (IAA oxidasa) que actúa regulando los niveles hormonales en los tejidos.

Algunos grupos de investigadores han logrado preparar auxinas sintéticas capaces de reproducir, en los vegetales, algunas o todas las acciones fisiológicas del IAA; la más conocida es el 2,4-diclorofenoxiacético, su acción es más prolongada e intensa que la del IAA, ya que la IAA oxidasa no la destruye.

Existen otros factores de crecimiento:

- Giberelinas: La acción de estas hormonas es muy amplia dependiendo del lugar del vegetal en que actúan y de la concentración de las otras hormonas presentes. Promueven la germinación, la elongación celular y actúan sobre la floración. A diferencia del IAA son altamente móviles en forma específica.
- Citocininas: Son necesarias para el crecimiento celular y la diferenciación, actuando en forma sinérgica con el IAA. Difieren del IAA y de las giberelinas pues son inmóviles y tienen acción local.

Existen inhibidores del crecimiento vegetal. Dentro de éstos se encuentra la dormina o abscisina. Su acción puede ser contrarrestada por la citocininas o por las giberelinas.

### VII.1.1.3. Inducción y crecimiento del callo

Pueden inducirse callos a partir de la mayoría de las plantas y la razón por la cual en algunos casos no se produce dicha inducción puede atribuirse a deficiencias en las condiciones de cultivo empleadas. Por supuesto, ciertas plantas responden más fácilmente que otras y diferentes partes de la misma planta exhiben diferentes respuestas.

Se sabe que las condiciones empleadas para la inducción del callo pueden reflejarse después en el establecimiento del cultivo, en particular, es importante la elección de la auxina. La composición del medio también afecta la morfología, la citología y las características metabólicas del cultivo y estas propiedades cambian con los subcultivos seriados.

Frecuentemente se obtienen estados fisiológicos especializados, como adaptación al habitat y la capacidad para diferenciarse disminuye o se pierde por completo.

La inestabilidad del callo es el principal obstáculo que aparece durante su uso cotidiano y lo que perjudica su utilización masiva (Yoeman y Forche, 1980).

## VII.2. BACTERIAS FOTOSINTETICAS

### VII.2.1. Aspectos generales

Las bacterias fotosintéticas comprenden una comunidad fisiológica de microorganismos acuáticos. Poseen bacterioclorofilas y pigmentos carotenoides. Todas las cepas estudiadas contienen citocromos, ubiquinonas y ferroproteínas no-hémicas del tipo de la ferredoxina. El metabolismo fotosintético ocurre en condiciones anaeróbicas y depende de la presencia de donores de electrones externos oxidables, como los compuestos de azufre reducidos, hidrógeno molecular y compuestos orgánicos. La fijación de dióxido de carbono transcurre a través del ciclo reductivo de las pentosas-fosfato. Los ftopigmentos están localizados en sistemas membranosos internos, continuos con la membrana citoplasmática, o bien en vesículas, características del género *Chlorobium*, las que se disponen adosadas a la membrana citoplasmática (Pfenning y Trüper, 1974).



VII.2.1.1. Clasificación

A continuación se nombran solamente los géneros más importantes de cada familia (Tabla VII.1.).

TABLA VII.1.: Clasificación de las bacterias fotosintéticas

ORDEN	SUBORDEN	FAMILIA	GENERO
Rhodospirillales	Rhodospirillineae	Rhodospirillaceae	<i>Rhodospirillum</i> <i>Rhodopseudomonas</i> <i>Rhodomicrobium</i>
		Chromatiaceae	<i>Chromatium</i> <i>Thiocystis</i> <i>Thiosarcina</i> <i>Thiospirillum</i> <i>Thiocapsa</i> <i>Lamprocystis</i> <i>Thiodictyon</i> <i>Thiopedia</i> <i>Anoebobacter</i> <i>Etothiorhodospira</i>
	Chlorobiineae	Chlorobiaceae	<i>Chlorobium</i> <i>Prosthecochloris</i> <i>Chloropseudomonas</i> <i>Pelodictyon</i> <i>Clathrochloris</i>

Debido a que en nuestro trabajo se utilizaron bacterias del género *Rhodopseudomonas*, solamente nos referiremos a este género.

VII.2.1.2. Rhodopseudomonas (Pfenning y Trüper, 1974)

Comprende bacterias en forma de bastones u ovoides a esféricas, que se multiplican por fisión binaria o por división asimétrica (brotación sin formación de pedúnculo), Gram negati-

vas, móviles por flagelo polar. Contienen bacterioclorofila  $\alpha$  ó  $\beta$  y carotenoides; ambos tipos de pigmentos están localizados en los sistemas membranosos internos de tipo vesicular o tubular (en las especies que se multiplican por fisión binaria) y lamelar (en las especies que se multiplican por brotación). No contienen vacuolas gaseosas.

Son fotótrofos anaeróbicos, algunas especies son capaces de llevar a cabo un metabolismo oxidativo en la oscuridad bajo condiciones microaerófilas o aeróbicas. Fotosintetizan en presencia de compuestos orgánicos de carbono siendo utilizados para la fotoasimilación directa y como fuente de poder reductor para la fijación de  $\text{CO}_2$ . El hidrógeno molecular puede usarse como donador de electrones pero en cambio no es útil para tal fin el azufre elemental. El oxígeno molecular no interviene durante la fotosíntesis.

Las distintas suspensiones celulares desarrollan diferentes colores debido a los pigmentos fotosintéticos.

#### VII.2.1.21. Rhodopseudomonas palustris

##### - Morfología

Tienen forma de bastón. El tamaño es variable y depende de la edad del cultivo y composición del medio. La movilidad se realiza por medio de flagelos polares o subpolares.

##### - Reproducción

Se reproducen por brotación; la célula madre produce un tubo delgado, cuya longitud es de 1,5-2 veces la célula original, en el extremo opuesto en el que está ubicado el flagelo. La división asimétrica produce una célula hija ovoide. La formación de rosetas y racimos, en los que se unen las células individuales entre sí por sus polos flagelados, es característica de los organismos que se encuentran en cultivos viejos.

##### - Color

Los cultivos líquidos anaeróbicos son al principio rosa pálido y su color se va intensificando virando al rojo y marrón rojizo a medida que envejecen. Los cultivos aeróbicos son inco-

loros o rosados.

La producción de pigmentos depende del medio de crecimiento. Poseen bacterioclorofila *a* y carotenoides.

#### - Metabolismo

Son organismos fotoorganotróficos, aeróbicos facultativos, que pueden crecer anaeróbicamente a la luz o aeróbicamente en oscuridad.

El crecimiento ocurre en un medio mineral adicionado de sustratos orgánicos simples, bicarbonato y suplementado con *p*-aminobenzoato como factor de crecimiento. El extracto de levadura estimula el desarrollo del cultivo. Crecen en un rango de pH entre 5,5 - 8,5 y de temperatura entre 30 - 37 °C.

Los sustratos utilizados como fuente de carbono (fotoasimilados) o donores de electrones fotosintéticos son: alcoholes, ácidos grasos, ácidos C<sub>4</sub>-dicarboxílicos, aminoácidos, benzoato.

Como fuente de nitrógeno utilizan sales de amonio.

Los materiales de reserva están constituidos por polisacáridos, poli- $\beta$ -hidroxibutirato.

#### VII.2.1.22. *Rhodospseudomonas spheroides*

##### - Morfología

Tienen forma esférica. En cultivos jóvenes la movilidad es por medio de flagelos polares.

##### - Reproducción

La multiplicación es por fisión binaria.

##### - Color

Los cultivos líquidos anaeróbicos primero son claros, luego marrón verdoso oscuro y finalmente marrón oscuro. Los cultivos crecidos en presencia de aire son de color rojo. El color marrón de los cultivos anaeróbicos puede cambiar a rojo por agitación con aire; la luz estimula el cambio de color.

La mayoría de los cultivos producen un pigmento rojo azulado, soluble en agua, de tipo porfirina, que se difunde dentro del medio de cultivo.

Poseen bacterioclorofila *a* y carotenoides incluyendo spheroidene e hidroxí-spheroidene, que son transformados a los correspondientes cetocarotenoides en condiciones aeróbicas con el cambio de color correspondiente.

#### - Metabolismo

Son fotoorganótrofos, aeróbicos facultativos, que pueden crecer anaeróbicamente a la luz o aeróbicamente en la oscuridad. El crecimiento ocurre en un medio mineral con sustratos orgánicos simples, bicarbonato y con el agregado de tiamina, biotina y ácido nicotínico. Para un desarrollo óptimo se requiere el agregado de extracto de levadura. El rango de pH óptimo es 6,0 - 8,5 y la temperatura óptima 25 - 30 °C.

Los sustratos orgánicos fotoasimilables son: etanol, fructosa, gluconato, glucosa, glicerol, manitol, manosa, sorbitol, tartrato, algunos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos y ácidos grasos de cadena corta en bajas concentraciones.

El hidrógeno molecular sirve como donador de electrones para el crecimiento.

No utilizan benzato, propionato, tiosulfato y sulfuro.

Como fuente de nitrógeno usan sales de amonio y algunos aminoácidos.

### VII.3. MATRICES ARTIFICIALES EN EL ESTUDIO DE REACCIONES BIOQUÍMICAS

#### VII.3.1. Aspectos generales

La compleja maquinaria química de la célula viva está dirigida por miles de enzimas diferentes, cada una de las cuales cataliza reacciones químicas particulares.

Indudablemente, la célula no funciona como un simple receptáculo de enzimas. Por el contrario, existen numerosas evidencias que indican que la gran mayoría de las enzimas intrace-

lulares actúan en un medio circundante que podría asemejarse a un gel, o bien adsorbidas en interfases o membranas, o formando parte de ensamblamientos de tipo cuasi-sólido como parecen existir en las mitocondrias y otras organelas celulares. Además, la distribución arquitectónica de las enzimas dentro de la célula, debe ser extremadamente precisa ya que de lo contrario, los sustratos sobre los cuales actúan cada una de ellas, así como los productos de reacción y la inmensa variedad de sustancias que podrían inhibir o modificar determinadas reacciones, se mezclarían en forma caótica.

Hasta hace relativamente poco tiempo, la mayoría de los estudios realizados sobre enzimas se efectuaban utilizando extractos más o menos purificados de las mismas, en soluciones acuosas diluídas, es decir, en condiciones bastante diferentes a las existentes dentro de la célula. Probablemente sólo las enzimas extracelulares llevan a cabo su función biológica en estas condiciones. Teniendo en cuenta estas consideraciones, los enzimólogos no podían asegurar si las propiedades químicas y físicas de las enzimas, determinadas *in vitro*, eran semejantes a las que poseían esas mismas enzimas en la célula viva (Batlle y col, 1976).

Lo ideal sería estudiar las enzimas intracelulares en su ambiente natural tratando de reconstruirlo por ejemplo, por recombinación de las enzimas aisladas, con el medio circundante con el cual están normalmente asociadas en la célula. Sin embargo, existen numerosas dificultades para trabajar de este modo. Otra alternativa, más práctica y sencilla, consiste en unir o asociar las enzimas aisladas a matrices artificiales mecánicamente estables, tales como soportes hidrofílicos, hidrofóbicos o inertes.

Estos sistemas enzima-matriz, no sólo pueden servir como modelos valiosos para estudiar el comportamiento de las enzimas en condiciones más similares a las de su medio natural, sino que también pueden emplearse como biocatalizadores más eficientes con mayores aplicaciones prácticas.

Las ventajas que ofrece el empleo de enzimas inmovilizadas son numerosas:

- 1) Frecuentemente se produce un aumento en la estabilidad de la enzima.

- 2) El sistema enzima-soporte puede separarse fácilmente de la solución, evitándose la contaminación entre la mezcla de reacción y la preparación enzimática.
- 3) Debido a la estabilidad de la enzima inmovilizada, es posible usar una misma preparación repetidas veces. De esta forma, pueden llevarse a cabo muchas más determinaciones que las que podrían realizarse con la misma cantidad de enzima en solución.
- 4) Es posible obtener ciertos reactivos inestables, empleando enzimas inmovilizadas. Sin embargo, esta alternativa no ha sido aún explotada convenientemente.

Para insolubilizar una proteína se deben tener en cuenta dos puntos importantes: la recuperación de la actividad catalítica y la estabilidad de la preparación. Generalmente parte de la actividad enzimática se pierde durante el proceso de inmovilización. Esto está relacionado principalmente con factores tales como el grado de modificación que sufre la proteína y las interacciones entre la enzima y la matriz.

Es difícil determinar la estabilidad de una preparación, esta propiedad puede verse aumentada o disminuida según el caso. Se puede hablar de estabilidad térmica, operacional y por estacionamiento.

La estabilidad térmica refleja la capacidad del sistema enzima-soporte para resistir temperaturas elevadas. Si la estabilidad térmica es mayor, la enzima puede usarse a temperaturas altas con un grado de eficiencia significativo.

La estabilidad frente al estacionamiento consiste simplemente en la capacidad de la preparación para retener su actividad bajo condiciones específicas de almacenamiento.

La estabilidad operacional no es sólo función de la enzima sino también de la durabilidad del carrier, concentración de inhibidores, etc.

Entre las matrices artificiales que se han empleado con éxito se encuentran los geles de dextrano (o Sephadex), de agarosa (Sepharosa o Biogel A), los polímeros de acrílico (o Biogel), poliaminoácidos, varias clases de celulosa y aún papel de filtro y vidrio o lana de vidrio.

La técnica de insolubilización de proteínas sobre soportes sólidos ha sido aplicada a numerosas proteínas con diferentes resultados. Svenson y Anderson (1977) inmovilizaron rodensasa de hígado bovino sobre agarosa y vidrio, logrando retener un 30% de su actividad inicial; los mismos autores reportaron mayor rendimiento y estabilidad cuando el sistema enzimático se conservaba en presencia de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  1 mM.

#### VII.3.1.1. Condiciones para el acople

Es importante la retención de la conformación activa de la proteína después del procedimiento de acople covalente.

La conformación nativa de una proteína está determinada por su secuencia de aminoácidos. Las uniones involucradas en el mantenimiento de las estructuras secundarias, terciarias y cuaternarias, excepto las uniones disulfuro, son del tipo no-covalente. Estas interacciones no-covalentes son uniones puente de hidrógeno y salinas e interacciones hidrofóbicas; cada una de ellas en forma individual son relativamente lábiles pero la suma de un gran número de estas uniones débiles es lo que confiere estabilidad a la estructura final de la proteína.

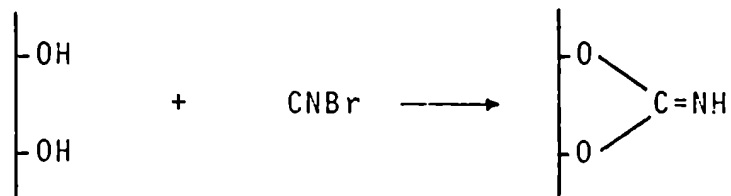
La reactividad de un cierto grupo en la proteína depende de su localización y del entorno en el cual los residuos de los aminoácidos están localizados. Los residuos aminoacídicos del sitio activo tienen propiedades y reactividades especiales; por lo tanto estos grupos serían los primeros en reaccionar con el soporte obteniéndose una proteína inmovilizada inactiva. Si el sitio activo está en la superficie de la proteína la posibilidad de reacción dependería de la relación entre el área y el sitio activo comparada con el área de la superficie proteica total. Debido a que la reacción de acople normalmente es fuerte, cualquier grupo reactivo sobre la proteína que interacciona con la matriz activada puede acoplarse, y en consecuencia, el sitio activo no estaría especialmente favorecido. Los sitios activos de las enzimas están generalmente en la parte recesiva o interna de la estructura proteica. La entrada en el sitio activo depende de la medida, estereoquímica y carga características del sustrato reactivo. En el caso de un grupo activo inmovilizado sobre un soporte sólido, la geometría de la situación puede ser un factor importante para que el sitio activo soporte el proce-

dimiento de acople.

Es posible que en aquellos casos en los cuales la modificación del sitio activo cause pérdida de actividad durante la inmovilización, el agregado de un sustrato o un inhibidor competitivo a la mezcla de acople proteja al sitio activo de la enzima de la pérdida de actividad (Srere y Uyeda, 1976).

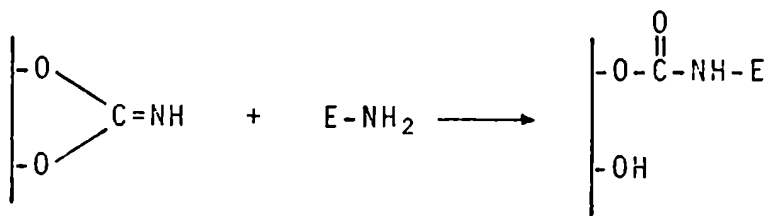
VII.3.1.11. Reacciones específicas de acople. Activación de Sepharosa con Bromocianógeno

El método más utilizado para el acople de proteínas a soportes es el de Axén y col (1967). Se basa en la activación de un polisacárido (Sepharosa) con bromuro de cianógeno, formándose un imidocarbonato de la Sepharosa (Reacción 1).



Reacción 1

La Sepharosa así activada se acopla luego con un grupo amino de la proteína para producir el derivado inmovilizado (Reacción 2).



Reacción 2

El acople de la proteína ocurre principalmente a través de los grupos  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lisina y del grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> del aminoácido N-terminal

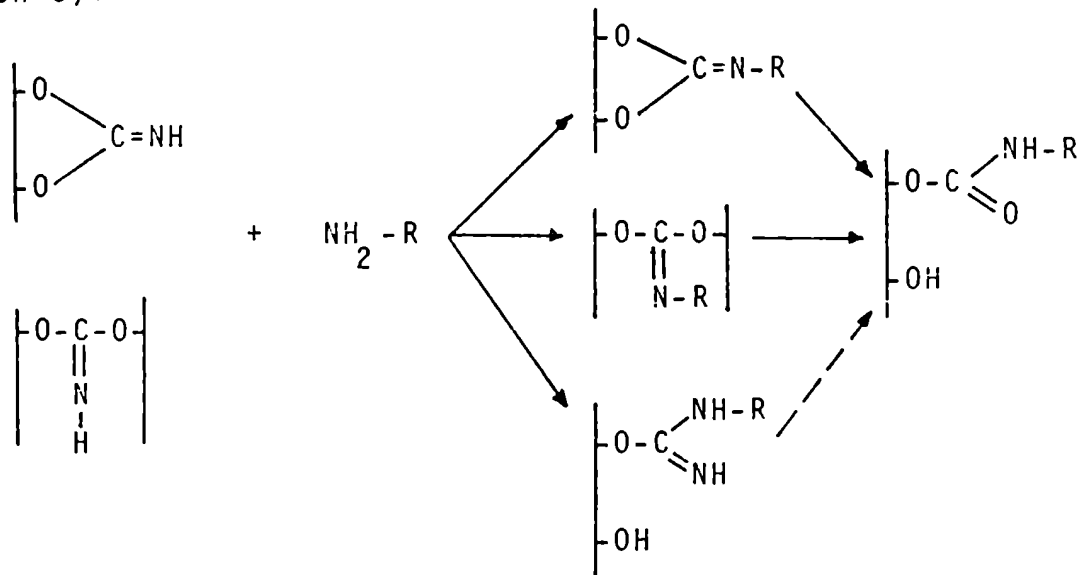
La reacción se lleva a cabo en solución acuosa alcalina o en una mezcla de agua y solventes orgánicos. La hidrólisis del reactivo, haluro de cianógeno, que ocurre como reacción lateral, es inevitable aunque puede minimizarse manteniendo las condiciones óptimas para la formación del imido-carbonato. A temperaturas por debajo de la ambiente se debe trabajar en un intervalo



de pH entre 11 - 12,5.

En la mayoría de los casos, existe un consumo de iones hidroxilo durante la reacción, con una concomitante disminución en el pH. Así para que el pH de reacción se mantenga debe adicionarse álcali constantemente o usar buffers fuertes.

Duante el acople de la enzima al soporte activado ocurren las siguientes reacciones (Axén y Ernback, 1971) (Reacción 3):



Reacción 3

Para que dichas reacciones se lleven a cabo, la amina debe estar desprotonada; esto sugiere que la reacción con la proteína ocurre a una velocidad óptima en un intervalo de pH entre 9 y 10.

Las propiedades del producto final obtenido son función de las condiciones del proceso de acople y de los reordenamientos que tienen lugar durante el almacenamiento de la preparación. Algunos derivados son muy estables y otros no. La formación de uniones múltiples entre la enzima y la matriz, incrementa notablemente la estabilidad ya que la posibilidad de ruptura de varias uniones, es mucho menor que la de una unión simple. Este argumento apoya el uso de geles imidocarbonato, altamente sustituidos.

Sin embargo, un gel de este tipo podría producir enzimas inmovilizadas de baja actividad. Deben elegirse las condiciones más favorables en lo que respecta a ambos factores, la estabilidad y la reactividad de la enzima a ser acoplada.

## REFERENCIAS

- Axén, & Ernback, S. (1971) Eur. J. Biochem. 18, 351.
- Axén, R.; Poroth, J. & Ernback, S. (1967) Nature (London) 214, 1302.
- Batlle, A.M. del C.; Xifra, E.A.; Stella, A.M.; Parera, V. & Rossetti, M.V. (1976) 5ta. Reunión Anual de la Soc. Arg. de Biofísica, Bs.As- 16-17 Dic.
- Miller, C.O. (1963) en "Modern Methods of Plant Analysis" (Springer-Berlag, Berlín) Vol 6, p.196.
- Pfenning, N. & Trüper, H.G. (1974) en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. (Eds. R.E. Buchanan y N. E. Gibbons) The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 24.
- Srere, P.A. & Uyeda, K. (1976) en "Methods in Enzymology" (Ed. Klaus Mosbach) Academic Press. Vol XLIV, p. 11.
- Svenson, A. & Anderson, B. (1977) Anal. Biochem. 83, 739.
- Yoeman, M.M. & Forche, E. (1980) en "International Review of Cytology", supplement 11 A. Academic Press. Cap. 1, p.1.

# **MATERIALES Y METODOS**

## CAPITULO I

### MATERIALES Y METODOS

---

	Página
I.1. Equipos utilizados	223
I.2. Reactivos	223
I.3. Fuentes enzimáticas	223
I.3.1. Callos de soya	223
I.3.1.1. Obtención del tejido	223
I.3.1.2. Cepas empleadas	224
I.3.1.3. Extracción de la proteína enzimática	224
I.3.2. Bacterias fotosintéticas	225
I.3.2.1. <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	225
I.3.2.11. Cepas empleadas	225
I.3.2.12. Cultivo y crecimiento	225
I.3.2.13. Extracción de la proteína enzimática	227
I.3.2.2. <i>Rhodopseudomonas spheroides</i>	227
I.3.2.21. Cepas empleadas	227
I.3.2.22. Cultivo y crecimiento	227
I.3.2.23. Extracción de la proteína enzimática	229
I.3.3. Eritrocitos	229
I.4. Enzimas utilizadas. Preparación	230
I.4.1. ALA-S	230
I.4.2. ALA-D	230
I.4.3. Mállico-Deshidrogenasa	231

	Página
I.4.4. Rodenasa	231
I.5. Determinación de actividades enzimáticas	231
I.5.1. Succinil-CoA-S	231
I.5.2. ALA-S	232
I.5.3. ALA-D	233
I.5.4. Mállico-Deshidrogenasa	234
I.5.5. Rodenasa	235
I.5.6. Cistationasa	235
I.6. Unidades enzimáticas	237
I.7. Determinación de la concentración proteica	237
I.7.1. Método de Lowry	237
I.7.1.1. Método de Lowry modificado	237
I.7.2. Determinación de proteínas por absorción U.V.	238
I.8. Determinación de azufre lábil	238
I.9. Determinación de pesos moleculares	238
I.10. Inmovilización de rodenasa	239
I.10.1 Activación del gel	239
I.10.2 Preparación de rodenasa insolubilizada	239
Referencias	241

## I. MATERIALES Y METODOS

### I.1. EQUIPOS UTILIZADOS

Las centrifugaciones refrigeradas se efectuaron en una centrífuga SORVALL RC-5B y las que no requerían refrigeración fueron realizadas en una centrífuga ROLCO modelo CM-36. Para las ultracentrifugaciones se utilizó un equipo SORVALL OTD 65 B.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en espectrofotómetros Beckman modelo DB o Metrolab RC 325 BD.

Para la sonicación del tejido se empleó un equipo Sonifier Cell Disruptor MSE Modelo W 185 D.

Los homogenatos se prepararon usando un Potter Elvehjem con émbolo de teflón.

Las fracciones enzimáticas se concentraron en un equipo Amicon empleando una celda modelo 52 y membranas PM 10.

### I.2. REACTIVOS

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

Se utilizaron además, geles de Sephadex y Sepharosa provenientes de Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Suecia.

### I.3. FUENTES ENZIMATICAS

#### I.3.1. Callos de Soya

##### I.3.1.1. Obtención del tejido

Las semillas de soya se sumergieron durante 15 minutos en una solución de  $\text{HgCl}_2$  0,1%; luego de enjuagarlas con agua destilada estéril se sembraron en un medio que contenía sales de Ca, Mg, Mn, Zn; vitaminas; glicina; sacarosa; EDTA ferroso y agar Bacto (Miller, 1963).

Se dejaron crecer en oscuridad a 27 °C hasta su germinación y los cotiledones se repicaron a nuevos erlenmeyers con el medio de Milier completo, es decir, adicionado de cinetina e indolacético, compuestos fundamentales para el desarrollo del tejido meristemático.

Los erlenmeyers conteniendo los cotiledones se incubaron en las condiciones antes descriptas hasta la aparición de los callos. Estos se repicaron periódicamente cada 14 días.

#### I.3.1.2. Cepas empleadas

En las experiencias realizadas se emplearon dos cepas:

- Cepa nueva: obtenida según el procedimiento descrito en el ítem anterior, repicada 34-36 veces.
- Cepa vieja: Este cultivo fue provisto por el Dr. Maroders del INTA (Castelar) en 1965 y se le habían realizado entre 405 y 407 subcultivos.

#### I.3.1.3. Extracción de la proteína enzimática

Todas las operaciones se realizaron a 4 °C.

Los homogenatos se prepararon en un Potter Elvehjem, con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 9,0 en la relación 1:2 (g de tejido húmedo/volumen).

Los extractos enzimáticos se centrifugaron inmediatamente a 6.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido se utilizó para las determinaciones de actividad enzimática.

### I.3.2. Bacterias fotosintéticas

#### I.3.2.1. Rhodospseudomonas palustris

##### I.3.2.11. Cepa empleada

Se utilizó una cepa salvaje perteneciente a la colección de la cátedra de Microbiología e Inmunología (FCE y N - UBA).

##### I.3.2.12. Cultivo y crecimiento

Las bacterias se hicieron crecer en el medio de Cohen-Bazire y col (1957), modificado por la adición de peptona y extracto de levadura. Dicho medio se prepara a partir de las siguientes soluciones:

- Solución 1: Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 6,8

- <u>Solución 2</u> : Acido D-L-málico	134,00 g
Acido L(+)-glutámico	50,00 g
Acetato de sodio	50,00 g
Cloruro de amonio	50,00 g

Se ajusta el pH a 6,8 con NaOH (lentejas) y se lleva a un volumen final de 1 litro con agua destilada.

- <u>Solución 3</u> : EDTA disódico.2 H <sub>2</sub> O	12,80 g
Sulfato de magnesio	14,50 g
Cloruro de calcio.2 H <sub>2</sub> O	3,67 g
Molibdato de amonio. 4 H <sub>2</sub> O	9,30 mg
Sulfato ferroso.7 H <sub>2</sub> O	99,00 mg
Acido nicotínico	50,00 mg
Clorhidrato de tiamina	25,00 mg
Biotina	1,00 mg
Metal "44"	50,00 ml

En primer lugar se disuelve el EDTA-disódico y se ajusta el pH a 6,8 con NaOH 10 M. La solución final de toda la mezcla se lleva a un volumen de 1 litro con agua destilada, controlándose el pH



- <u>Metal "44"</u> : EDTA disódico.2 H <sub>2</sub> O	2,900 g
Sulfato de zinc.7 H <sub>2</sub> O	10,950 g (2,5 g Zn)
Sulfato ferroso.7 H <sub>2</sub> O	5,000 g (1 g Fe)
Sulfato de manganeso. H <sub>2</sub> O	1,540 g (500 mg Mn)
Sulfato de cobre.5 H <sub>2</sub> O	0,392 g (100 mg Cu)
Nitrato de cobalto.6 H <sub>2</sub> O	0,248 g (50 mg Co)
Borax.10 H <sub>2</sub> O	0,177 g (2 mg B)

Se agregan unas gotas de ácido sulfúrico para retardar la precipitación y se lleva a 1 litro con agua destilada.

Para preparar un litro de medio se mezclan las soluciones en la siguiente relación:

- 40 ml Solución 1
- 20 ml Solución 2
- 20 ml Solución 3

y se agrega 1 g de peptona y 1 g de extracto de levadura, controlándose el pH final.

Se esteriliza en autoclave a 1,5 atm durante 15 minutos. En este tratamiento suele formarse un precipitado considerable, que se redisuelve al enfriarse el medio.

Para el mantenimiento de la cepa se utilizaron células crecidas a la luz sembradas por punción en tubos de agar (1%), conteniendo extracto de levadura (1 %).

El crecimiento en medio líquido se efectuó en tubos de 30 ml, a partir de punciones del sólido, los cuales se transfieren luego a erlenmeyers de 125 ml. De esta forma se obtiene una cantidad suficiente de inóculo para repicar a erlenmeyers de un litro. El desarrollo se realizó a 30 °C durante aproximadamente 72 horas, en semianaerobiosis y bajo una intensidad luminosa de 900 ftc.

Las células se cosecharon por centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos y se lavaron una vez con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4, almacenándose las a - 20 °C hasta el momento de su uso.

### I.3.2.13. Extracción de la proteína enzimática

El tejido cosechado y lavado se resuspendió en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 hasta obtener una suspensión cuyo peso seco fuese aproximadamente 60 mg/ml determinado por su absorbancia a 680 nm de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{peso seco (mg/ml)} = 0,66 \times A_{680 \text{ nm}} \times \text{dilución}$$

En condiciones standard la suspensión se sonicó durante 30 segundos a 8 micrones en volúmenes de 5-6 ml, diluyéndose posteriormente 3 veces con el mismo buffer. La fracción obtenida se denominó extracto crudo (EC).

Por centrifugación del EC 25.000 x g durante 30 minutos se separaron las fracciones sobrenadante (S) y pellet (P). En las determinaciones requeridas el pellet se resuspendió en un volumen de buffer igual al del sobrenadante.

### I.3.2.2. Rhodopseudomonas spheroides

#### I.3.2.21. Cepa empleada

Se utilizó una cepa salvaje (N.C.I.B. 8253) cedida por el profesor A. Neuberger del Charing Cross Hospital Medical School de Londres, Inglaterra.

#### I.3.2.22. Cultivo y crecimiento

Las bacterias se hicieron crecer en el medio S de Lascelles (1956). Dicho medio se prepara a partir de las siguientes soluciones:

- <u>Solución 1</u> : L-glutamato de sodio. H <sub>2</sub> O	77,20 g
Acido D-L málico	55,20 g
Fosfato monobásico de potasio	10,00 g
Fosfato dibásico de potasio	10,00 g
Fosfato dibásico de amonio	16,00 g
Sulfato de magnesio.7 H <sub>2</sub> O	4,00 g
Cloruro de calcio.6 H <sub>2</sub> O	0,80 g

Se disuelve en agua destilada y se ajusta el pH a 6,8 con NaOH 10 M. Luego se agrega:

Sulfato amónico ferroso	0,08 g
Cloruro de manganeso	0,02 g

Se lleva a 1 litro con agua destilada. Se conserva a - 20 °C.

- Solución 2: Acido nicotínico/tiamina                    2 mg/ml H<sub>2</sub>O (d)
- Solución 3: Biotina    0,1 mg/ml H<sub>2</sub>O (d)

Para preparar 1 litro de medio se mezclan las soluciones en la siguiente relación:

- 50 ml Solución 1
- 0,5 ml Solución 2
- 0,1 ml Solución 3

Se esteriliza con vapor a 1,5 atm durante 15 minutos.

Para el mantenimiento de la cepa se utilizaron células crecidas a la luz sembradas por punción en tubos de agar (1%) y extracto de levadura (1%).

El crecimiento en medio líquido, a partir de punciones del sólido, se efectuó en tubos conteniendo 15 ml; éstos se transfirieron luego a erlenmeyers de 250 ml con aproximadamente 100 ml de medio. De esta forma se continuó el repique del inóculo a erlenmeyers con mayor cantidad de medio. El desarrollo se realizó a 30 °C durante aproximadamente 72 horas, en semianaerobiosis y bajo una intensidad luminosa de 900 ftc.

Las células se cosecharon por centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos y se lavaron dos veces con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,4; se almacenaron a - 20 °C hasta el momento de su uso.

### I.3.2.23. Extracción de la proteína enzimática

El tejido cosechado y lavado se resuspendió en buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,4 hasta obtener una suspensión cuyo peso seco fuese aproximadamente 50 mg/ml determinado por su absorbancia a 680 nm de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{peso seco (mg/ml)} = 0,5 \times A_{680 \text{ nm}} \times \text{dil.}$$

La suspensión se sonicó durante 3 minutos a 14 micrones en volúmenes de 5 - 6 ml diluyéndose posteriormente 3 veces en el mismo buffer con el agregado de  $\beta$ -mercaptoetanol 0,01 M. La fracción obtenida, denominada extracto crudo, se centrifugó a 25.000 x g durante 20 minutos. Se separaron las fracciones sobrenadante (S) y pellet (P). El sobrenadante se utilizó como fuente enzimática.

### I.3.3. Eritrocitos

Se emplearon glóbulos rojos de:

- a) Conejos: Se utilizaron conejos normales e intoxicados por plomo. El metal se administró en el agua de bebida provista "ad-libitum", en una concentración de 500 mg de acetato de plomo por litro de agua, durante una semana. En el momento del sacrificio, a cada animal se le inyectó 3 ml de heparina (100 mg/8 ml de solución fisiológica) en la vena de la oreja. Los animales anestesiados con pentobarbital sódico (administración i.p., dosis 40 mg/kg de peso) se desangraron. La sangre se recogió en tubos heparinizados (0,1 ml de heparina; 12,5 mg/ml de solución fisiológica, por cada 10 ml de sangre); se centrifugó a 6.000 x g, se descartó el plasma, y los glóbulos rojos (GR) se lavaron con solución fisiológica.
- b) Humanos: Se utilizó sangre obtenida por punción venosa de dadores voluntarios normales del Hospital Ramos Mejía o de pacientes porfíricos que asistían al CIPYP. 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 6.000 x g, se descartó el plasma, y los glóbulos rojos (GR) se lavaron con solución fisiológica. Los eri-

trocitos se lisaron por congelamiento y descongelamiento tres veces y se diluyeron 1:15 (excepto se indique lo contrario) en buffer Tris ClH 0,05 M pH 7,4.

#### I.4. ENZIMAS UTILIZADAS. PREPARACION

##### I.4.1. ALA-S

Se purificó a partir de *Rp. spheroides*, según el método de Fanica-Gaignier y Clément-Metral (1971) con algunas modificaciones.

El sobrenadante obtenido luego de la centrifugación a 25.000 x g, se ultracentrifugó 90 minutos a 254.000 x g. La fracción sobrenadante se sometió a una precipitación con sulfato de amonio entre 25-40% de saturación. El pellet se resuspendió en buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,4 +  $\beta$ -mercaptoetanol 0,01 M y se dializó contra buffer fosfato de potasio 0,05 M pH 7,4 +  $\beta$ -mercaptoetanol 0,01 M.

##### I.4.2. ALA-D

Se purificó a partir de eritrocitos de conejos: normal e intoxicado por plomo.

La hemoglobina se eliminó utilizando la técnica de Scott (1976) con las modificaciones indicadas y el ALA-D se purificó por el método de Bustos y col (1980). Los glóbulos rojos lavados dos veces con solución isotónica de cloruro de sodio, se llevaron a pH 8,0 con hidróxido de amonio concentrado. Luego se añadió 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 24.000 x g 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).

Este procedimiento elimina la hemoglobina y produce una preparación de ALA-D purificada 24 veces.

El sobrenadante dializado se fraccionó con sulfato de a

monio utilizándose la fracción 30-55% de saturación, disuelta en el mínimo volumen de buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 6,8.

#### I.4.3. Málico-deshidrogenasa

La enzima se adquirió en Sigma Chem. Co. en forma de suspensión cristalina en solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2,8 M- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,005 M pH 7,5.

#### I.4.4. Rodenasa

La purificación de esta enzima a partir de *Rp. palustris* y de eritrocitos humanos se describe en los Capítulos II y III de la sección Resultados y Discusión.

### I.5. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

#### I.5.1. Succinil-CoA-S

Se determinó de acuerdo al método de Wider de Xifra y Tigier (1971).

- Sistema de incubación: La mezcla de reacción contenía los siguientes reactivos en un volumen final de 2 ml: 200  $\mu\text{moles}$  de succinato de sodio 10  $\mu\text{moles}$  de ATP (en buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,5); 10  $\mu\text{moles}$  de  $\text{MgCl}_2$ ; 0,1 mg de CoASH; 20  $\mu\text{moles}$  de glutatión; 100  $\mu\text{moles}$  de buffer Tris-ClH pH 9,0; 960  $\mu\text{moles}$  de  $\text{NH}_2\text{OH}$  y 0,5 ml de solución enzimática.

Se incubó durante 60 minutos a 37 °C, aeróbicamente con agitación mecánica y en oscuridad.

- Sistema de medición: La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de una mezcla que contenía:  $\text{FeCl}_3$  5% en ClH 0,1 M; ClH 3 N y TCA 25% en la relación 1:1:1 en volumen. Se centrifugó a 6.000 x g durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 540 nm. Los nmoles de producto se calcularon de la curva de calibración realizada con anhídrido succínico, hidroxilamina y reactivo férrico.

### I.5.2. ALA-S

Se determinó de acuerdo al método de Wider de Xifra y col (1971).

#### - Sistema de incubación:

Para la medición de actividad en callos de soya, la mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 50  $\mu$ moles de succinato de sodio; 5  $\mu$ moles de ATP; 13  $\mu$ moles de  $MgCl_2$ ; 0,060  $\mu$ moles de CoASH; 5  $\mu$ moles de glutatión; 25  $\mu$ moles de buffer Tris-ClH pH 7,2; 50  $\mu$ moles de glicina; 0,04  $\mu$ moles de PyP; 0,5 mg de succinil CoA-S purificada de la misma fuente y cantidad apropiada de extracto enzimático.

. Para la medición de actividad en *Rp. spheroides*, la mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 50  $\mu$ moles de succinato de sodio; 5  $\mu$ moles de ATP; 6  $\mu$ moles de  $MgCl_2$ ; 0,06  $\mu$ moles de CoASH; 25  $\mu$ moles de buffer Tris-ClH pH 7,4; 50  $\mu$ moles de glicina; 0,04  $\mu$ moles de PyP; 0,05 ml de una suspensión de Suc. CoA-S purificada de la misma fuente y extracto enzimático.

. Para la medición de actividad en sangre, la mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 50  $\mu$ moles de succinato de sodio; 6  $\mu$ moles de ATP; 6  $\mu$ moles de  $MgCl_2$ ; 0,06 moles de CoASH; 3  $\mu$ moles de glutatión; 25  $\mu$ moles de Tris-ClH pH 7,4; 50  $\mu$ moles de glicina; 0,04  $\mu$ moles de PyP; 2  $\mu$ moles de EDTA; 0,05 ml de una preparación de Suc.CoA-S (purificada a partir de *Rp. spheroides*, actividad: 43,8 moles/h x ml enzima) y 0,5 ml de hemolizados.

En todos los casos se incubó 60 minutos a 37 °C.

- Sistema de medición: La reacción se detuvo por el agregado de 1 ml de TCA 10%. Se centrifugó a 6.000 x g durante 10 minutos. La concentración de ALA formado se determinó según el método de Mauzerall y Granick (1956). A una alícuota del sobrenadante se le adicionó acetil-acetona y la mezcla resultante se condensó a 100 °C durante 10 minutos. Al pirrol formado se le agregó igual volumen del reactivo de Ehrlich modificado y se leyó la absorbancia a 555 nm entre 8 y 15 minutos después del

agregado del reactivo.

La cantidad de ALA formado se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles ALA/ml enz.} = \frac{A^{553} \times 10^3 \times 4,15 \times 2}{\epsilon \times \text{vol}_{\text{enz}}}$$

donde:  $A^{553}$  = Absorbancia a 553 nm

4,15 ml = volumen final luego del agregado del Ehrlich

2 ml = volumen después de desproteínizar

$\epsilon$  =  $7,2 \times 10^6$  (coeficiente de extinción molar)

Vol.enz. = Volumen de extracto enzimático incubado

### I.5.3. ALA-D

#### - Sistema de incubación y medición

. Para la medición de actividad en callos de semilla de soya se utilizó el método de Tigier y col (1970). La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2,5 ml: 5  $\mu$ moles de ALA, 200  $\mu$ moles de buffer Tris-ClH pH 8,8 y 1 ml de solución enzimática.

Se incubó en oscuridad, con agitación constante durante 60 minutos a 37 °C en anaerobiosis. La reacción se detuvo por el agregado de 0,5 ml de TCA 25%. Se centrifugó a 6.000 x g durante 10 minutos.

. Cuando se midió la actividad enzimática en glóbulos rojos, se utilizó el método de Batlle y col (1967).

El sistema de incubación contenía: 5  $\mu$ moles de ALA, 100  $\mu$ moles de buffer fosfato de sodio pH 6,8 y extracto enzimático. Luego de 1 hora de incubación a 37 °C en aerobiosis, la reacción se detuvo por el agregado de 0,2 ml de TCA 50 %. Se centrifugó 10 minutos a 6.000 x g.

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



$$\text{nmoles PBG/ml enz.} = \frac{A^{555} \times \text{Vol. inc.} \times 10^6}{\epsilon \times \text{PM} \times \text{Vol. enz.}}$$

donde:  $A^{555}$  = Absorbancia a 555 nm

Vol. inc. = Volumen final de incubación

$\epsilon$  = 113,6 (absorción de una solución de PBG de concentración de 1 mg/ml)

PM = 226

Vol. enz. = Volumen de enzima incubado

#### I.5.4. Málico-Deshidrogenasa

La actividad se determinó de acuerdo al método de Kun y col (1963).

- Sistema de incubación y medición: La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 3 ml: 300  $\mu$ moles de buffer fosfato de potasio pH 7,4; 0,2  $\mu$ moles de oxalacético; 0,1 ml de NADH (3,5 mg/ml) y extracto enzimático. El pH de la mezcla buffer-oxalacético se mantuvo entre 7,3-7,6. Dicha mezcla se incubó 10 minutos a 25 °C. Luego se agregó NADH y se midió la absorbancia inicial a 340 nm. Se agregó la enzima y se siguió el curso de la reacción a 340 nm. Los nmoles de producto formado se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles málico/ml enz.} = \frac{\Delta A^{340} \times \text{Vol. inc.} \times 10^3}{\epsilon \times \text{Vol. enz.}}$$

donde:  $\Delta A^{340}$  = variación entre la absorbancia inicial y final a 340 nm.

Vol. inc. = Volumen final de incubación

$\epsilon$  = 6.300 (coeficiente de extinción molar)

Vol. enz. = Volumen de enzima incubado

#### I.5.5. Rodenasa

El método utilizado se basa en el descrito por Sörbo (1957).

- Sistema de incubación: La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2 ml: 100  $\mu$ moles de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; 100  $\mu$ moles de buffer Tris-ClH pH 8,7; 100  $\mu$ moles de una solución que contiene 0,4 moles de HCl por mol de NaCN y la cantidad de enzima correspondiente en cada caso.  
La reacción se inició por el agregado de NaCN, incubándose a 37 °C durante 30 minutos (excepto que se especifiquen otras condiciones).
- Sistema de medición: La reacción 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  $\text{HNO}_3(\text{c})$ , llevados a 100 ml con agua destilada). Se centrifugó a 6.000 x g durante 10 minutos y se leyó la absorbancia en el sobrenadante a 460 nm.  
Cuando se trabajó con la enzima inmovilizada, se centrifugó la mezcla de reacción a 4 °C para decantar el gel y al sobrenadante se le agregó el formol y reactivo férrico.  
Los valores de tiocianato formado se obtuvieron de curvas de calibración realizadas con NaSCN 1 mM (Figura I.1.).

#### I.5.6. Cistationasa

El método utilizado se basa en el descrito por Flavin y Slaughter (1964).

- Sistema de incubación: La mezcla de incubación contenía los siguientes reactivos en un volumen final de 1 ml: 0,2  $\mu$ moles de cistina; 0,1  $\mu$ moles de PyP; 50  $\mu$ moles de buffer Tris-ClH pH 8,5 y 0,5 ml de solución enzimática.  
Se incubó durante 1 hora a 37 °C, en aerobiosis y con agitación mecánica.
- Sistema de medición: La reacción se detuvo por el agregado de 0,15 ml de TCA 25%, centrifugándose luego a 6.000 x g durante 10 minutos.

A una alícuota del sobrenadante (llevado a pH 7,3) se le agregaron los siguientes reactivos en un volumen final de 3 ml: 300  $\mu$ moles buffer fosfato pH 7,5 y 0,50  $\mu$ moles de NADH. La mezcla se llevó a 37 °C en baño de incubación; se agregó 0,01 ml de láctico deshidrogenasa (adquirida en Manhein-Boehringer, suspensión en sulfato de amonio) y se midió inmediatamente la disminución de la absorbancia a 340 nm en 90 segundos o hasta valor constante, determinándose por este método los nmoles de NADH consumidos.

La cantidad de producto formado se obtuvo de una curva de calibración realizada con cantidades conocidas de ácido pirúvico.

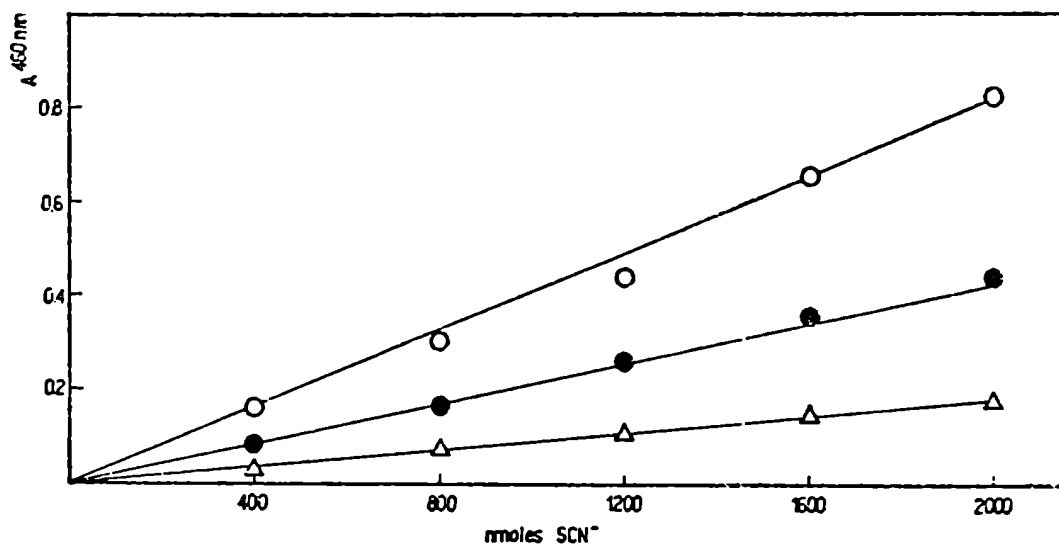


FIGURA I.1.: Curva de calibración utilizada para determinar la actividad de rodenasa. La recta obtenida relaciona los valores de absorbancia obtenidos a 460 nm con la cantidad de nmoles de NaSCN de la solución stand dard preparada.

(○) dil 1:3

(●) dil 1:5

(△) dil 1:10

## I.6. UNIDADES ENZIMATICAS

Se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de producto en las condiciones standard de incubación. La actividad específica se define como el número de unidades por mg de proteína.

## I.7. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION PROTEICA

### I.7.1. Método de Lowry

Se empleó la metodología de Lowry y col (1951) según la cual a 0,4 ml de una dilución apropiada de la proteína enzimática se le agregaron 2 ml de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% en  $\text{NaOH}$  0,1 N:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0,5% en tartrato de sodio y potasio 1% (20:0,4 v/v). Se mezcló y se dejó reaccionar a temperatura ambiente 10 minutos. Se agregaron 0,2 ml del reactivo de Folin-Ciocolteau, se agitó y se dejó desarrollar el color azul característico del complejo formado. Después de 30 minutos se leyó la absorbancia a 660 nm, calculándose la cantidad de proteína de la curva de calibración correspondiente. En el caso en el cual la solución proteica posea  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , la curva de calibración correspondiente se realizó disolviendo la proteína standard en buffer que contenía dicho reactivo.

### I.7.1.1. Método de Lowry modificado

Para determinar la cantidad de proteínas insolubles, la técnica de Lowry se modificó de la siguiente manera: 0,1 ml del extracto proteico se colocó en un tubo y se secó al vacío en un recipiente conteniendo una atmósfera deshidratada constituida por  $\text{H}_2\text{SO}_4(\text{c})$  (30 ml) y un tubo Pyrex con lentejas de  $\text{NaOH}$ . El recipiente se sumergió en un baño de agua a 80 °C. Los vapores ácidos se neutralizaron colocando un intermediario con lentejas de  $\text{NaOH}$ .

La proteína seca se resuspendió en  $\text{NaOH}$  0,6 M, y se calentó en baño de agua a 40-50 °C durante 30 minutos.

Se mezclaron 0,4 ml de una dilución apropiada de esta solución proteica con 2 ml de una mezcla de composición similar

a la descrita en el ítem anterior, pero sin NaOH y se procedió a continuación según el método original de Lowry.

#### I.7.2. Determinación de proteínas por absorción al U.V.

Se utilizó el método de Warburg y Christian (1941) basado en la absorción de las proteínas a 280 nm.

La interferencia debido a los ácidos nucleicos se considera midiendo la absorbancia a 260 nm.

Este método se empleó sólo para obtener en forma rápida los perfiles de elución proteica en los casos de cromatografía en columna. La cantidad de proteína se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\text{mg/ml} = (1,45 A^{280 \text{ nm}} - 0,74 A^{260 \text{ nm}}) \times \text{dil.}$$

#### I.8. DETERMINACION DE AZUFRE LABIL

Se determinó de acuerdo a una modificación del método de Koh (1965).

A 100  $\mu\text{l}$  de extracto se le agregó 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{NH}_3$  1 M, 125  $\mu\text{l}$  de KCN 0,1 M y 1 ml de agua destilada. Se dejó 45 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este lapso se agregaron 125  $\mu\text{l}$  de reactivo férrico y se leyó la absorbancia a 460 nm contra blanco de agua. Se realizó un control al que se le añadió el KCN después del reactivo férrico.

La cantidad de sulfocianuro formado se obtuvo de una curva de calibración.

#### I.9. DETERMINACION DE PESOS MOLECULARES

La filtración por geles es un método rápido y simple para determinar el peso molecular (PM) de distintas proteínas.

Para el armado de las columnas así como para el tratamiento previo de los geles se siguió la técnica descrita por Batlle (1968). Se emplearon geles de Dextrano (Sephadex), esti-

mándose el PM según la metodología de Andrews (1964, 1965).

En el caso de Sephadex G-100, se empleó una columna de 2,8 cm de diámetro x 50 cm de largo, con un volumen de gel de 205 ml, eluyéndose con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,4 con un flujo de 40 ml/h.

## I.10. INMOVILIZACION DE RODENASA

### I.10.1. Activación del gel

La activación de los geles de agarosa se realizó según el método descrito por Cuatrecasas (1970): 10 ml de Sepharosa 4B decantada se mezclaron con igual volumen de agua fría colocándose el recipiente en baño de hielo y sal. A la suspensión de Sepharosa se le añadió con agitación constante bromuro de cianógeno (aproximadamente 200 mg/ml de Sepharosa decantada) disuelto en un mínimo volumen de agua fría. El pH se mantuvo alrededor de  $11 \pm 0,3$  a lo largo de la reacción, mediante el agregado de OHNa 5 M. La reacción se completó dentro de los 8 - 10 minutos.

La Sepharosa activada se volcó sobre un buchner frío y se lavó con 20 volúmenes de buffer borato de sodio 0,01 M pH 8,5 aplicando vacío suave y evitando que el gel se secase. Esta operación se realizó en un lapso de 2 a 5 minutos.

El gel activado y lavado se centrifugó y se resuspendió en buffer borato de sodio 0,1 M pH 8,5 a su volumen original.

### I.10.2. Preparación de rodenasa insolubilizada

Se utilizó como fuente enzimática una fracción de *Rp. palustris*, purificada 24 veces, según se detalla en el Capítulo II de la sección Resultados y Discusión. Dicha fracción enzimática se concentró hasta obtener una concentración de 2 mg de proteína/ml, utilizando un Amicon a una presión de 2 atm y empleando una membrana PM 10. El flujo del eluido se mantuvo en 20 ml por hora.

Al gel previamente activado, se le agregó igual volumen de la fracción enzimática concentrada en presencia de tiosulfa-

to de sodio 1 mM (excepto se especifique lo contrario) y la mezcla se dejó en agitación constante a 6 °C durante 18 horas.

La Sepharosa sustituida se volcó en columnas de dimensiones apropiadas; se dejó decantar el gel, se eluyó el volumen sobrenadante y se procedió al lavado de la columna con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 8,7 + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1 mM (excepto se aclaren otras condiciones).

Los eluidos se recogieron en fracciones de 3 ml y a cada una de ellas se les determinó actividad enzimática y proteínas.

La Sepharosa acoplada se resuspendió en el buffer especificado llevándose al doble de su volumen decantado; a esta fracción se le midió actividad y se la utilizó como fuente de rodenasa inmovilizada.

## REFERENCIAS

- Andrews, P. (1964) Biochem. J. 91, 222.
- Andrews, P. (1965) Biochem. J. 96, 595.
- Batlle, A.M. del C. (1968) Ciencia e Investigación 24, 242.
- Batlle, A.M. del C.; Ferramola, A.M. & Grinstein, M. (1967) Biochem. J. 104, 244.
- Bustos, N.; Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A. M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 745.
- Cohen-Bazire, G.; Sistrom, W.R. & Stanier, R.Y. (1957) J. Cell.Comp. Physiol. 49, 25.
- Cuatrecasas, P. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3059.
- Fanica-Gaignier, M. & Clément-Metral, J.D. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 192.
- Flavin, M. & Slaughter, C. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2212.
- Koh, T. (1965) Bull. Chem. Soc. Japan 38, 1510.
- Kun, F. en Boyer, P.D.; Lardy, H.A. & Mirbach, M. (1963) en "The Enzymes" Ac. Press, N.Y. London, Vol 7 (A), 149.
- Lascelles, J. (1956) Biochem. J. 62, 78.
- Lowry, O.; Rosenbrough, N.; Farr, L. & Randall, R. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1956) J. Biol. Chem. 219, 435.
- Miller, C.O. (1963) en "Modern Methods of Plant Analysis", (Springer-Verlag, Berlín) Vol.6, p. 196.
- Moore, M. & Labbe, R. (1964) Clin. Chem. 10, 1105.
- Scott, J. (1976) Prep. Biochem. 6, 147.
- Sörbo, B.H. (1957) Acta Chem. Scand. 7, 32.
- Tigier, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Locascio, G.A. (1970) Enzymology 38, 43.
- Warburg, O. & Christian, W. (1941) Biochem. Z. 310, 384.
- Wider de Xifra, E.A. & Tigier, H.A. (1971) Enzymology 41, 217.



- Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A.M. del C. & Tigier, H.A.  
(1971) Biochim. Biophys. Acta 235, 511.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

## CAPITULO I

### RODENASA DE CULTIVOS DE CALLOS DE SOYA

---

	Página
I.1. Generalidades	243
I.2. Condiciones óptimas para la determinación de la actividad de rodenasa	243
I.2.1. Buffer de extracción de la proteína enzimática	243
I.2.2. Tiempo óptimo de incubación	243
I.2.3. pH óptimo de incubación	245
I.2.4. Concentración óptima de proteína	246
I.3. Biosíntesis de porfirinas en cultivos de callos de soya	248
I.3.1. Niveles Suc.CoA-S, cistationasa, rodenasa, ALA-S y ALA-D en clones de diferente edad	248
I.4. Conclusiones	252
Referencias	254

## I. RODENASA DE CULTIVOS DE CALLOS DE SOYA

### I.1. GENERALIDADES

Wider de Xifra y col (1971) demostraron que los niveles de ALA-S en cultivos de callos de soya variaban en función de los días de crecimiento del tejido, alcanzando su máximo valor a los 11 días. También, los mismos autores detectaron la existencia de un compuesto regulador y postularon que el mismo sería responsable de los cambios en la actividad de ALA-S, observados por estacionamiento de extractos crudos o sobrenadantes de homogenatos del tejido mencionado.

Posteriormente, Wider de Xifra y col (1976) hallaron que la trisulfocistina era un activador del ALA-S de *Rp. spheroides* y comprobaron que la síntesis y degradación de ese polisulfocompuesto era efectuado por la cistationasa y la rodenasa respectivamente.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió investigar la presencia de rodenasa en callos de soya y su posible acción regulatoria sobre la actividad del ALA-S.

### I.2. CONDICIONES OPTIMAS PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE RODENASA

#### I.2.1. Buffer de extracción de la proteína enzimática

El extracto enzimático se preparó utilizando los siguientes buffers: 1) Tris-ClH 0,05 M y 2) Glicina-NaOH 0,1 M a distintos pH's.

De los resultados obtenidos (Figura I.1.) se decidió utilizar buffer Tris-ClH 0,05 M pH 9,0 para la extracción de rodenasa en todas las experiencias siguientes.

#### I.2.2. Tiempo óptimo de incubación

Se estudió la variación de la actividad de rodenasa en función del tiempo de incubación, utilizando la preparación en-

zimática obtenida por extracción con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 9,0.

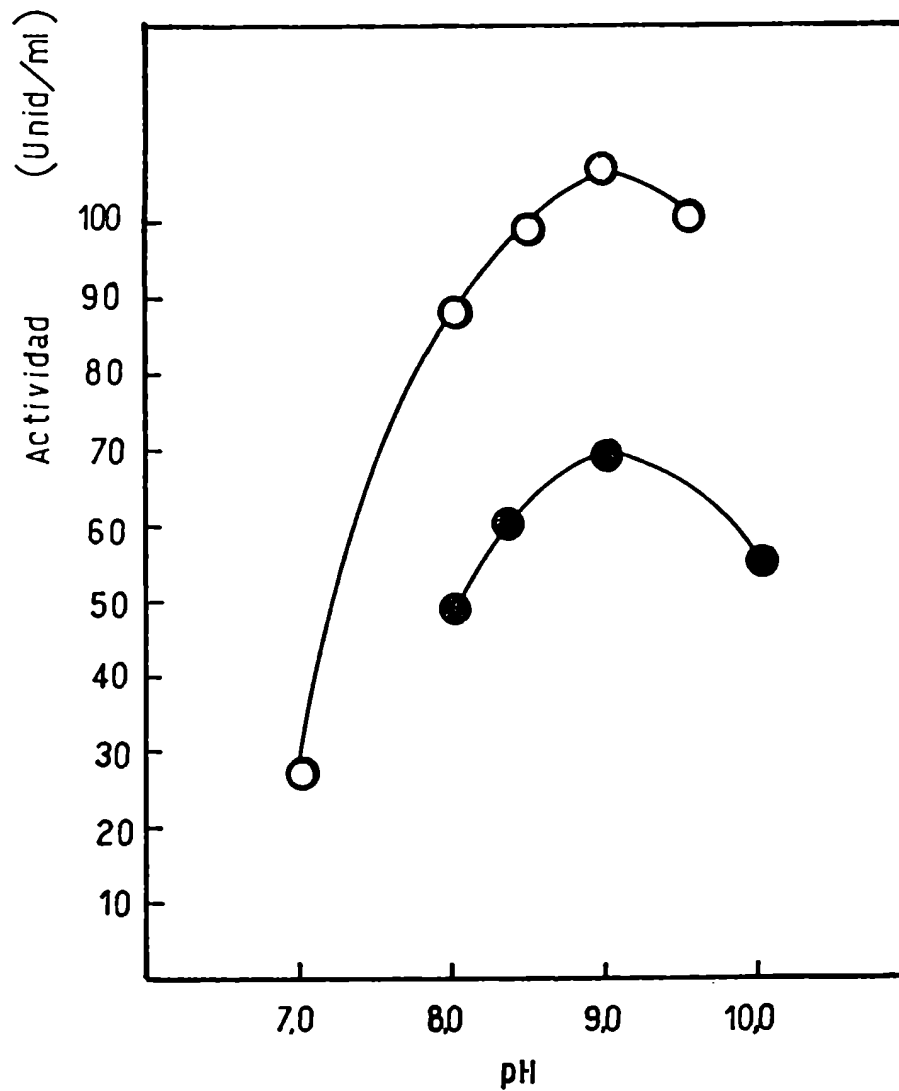


FIGURA I.1.: Buffer de extracción.  
 La actividad se midió según se describe en Materiales y Métodos.  
 Se usaron callos viejos crecidos durante 14 días en oscuridad.  
 ○ Buffer Tris-ClH; ● Buffer glicina-NaOH.

En la Figura I.2. se muestran los valores obtenidos comprobándose que la formación de producto guarda una relación lineal con el tiempo de incubación, adoptándose 30 minutos como intervalo standard.

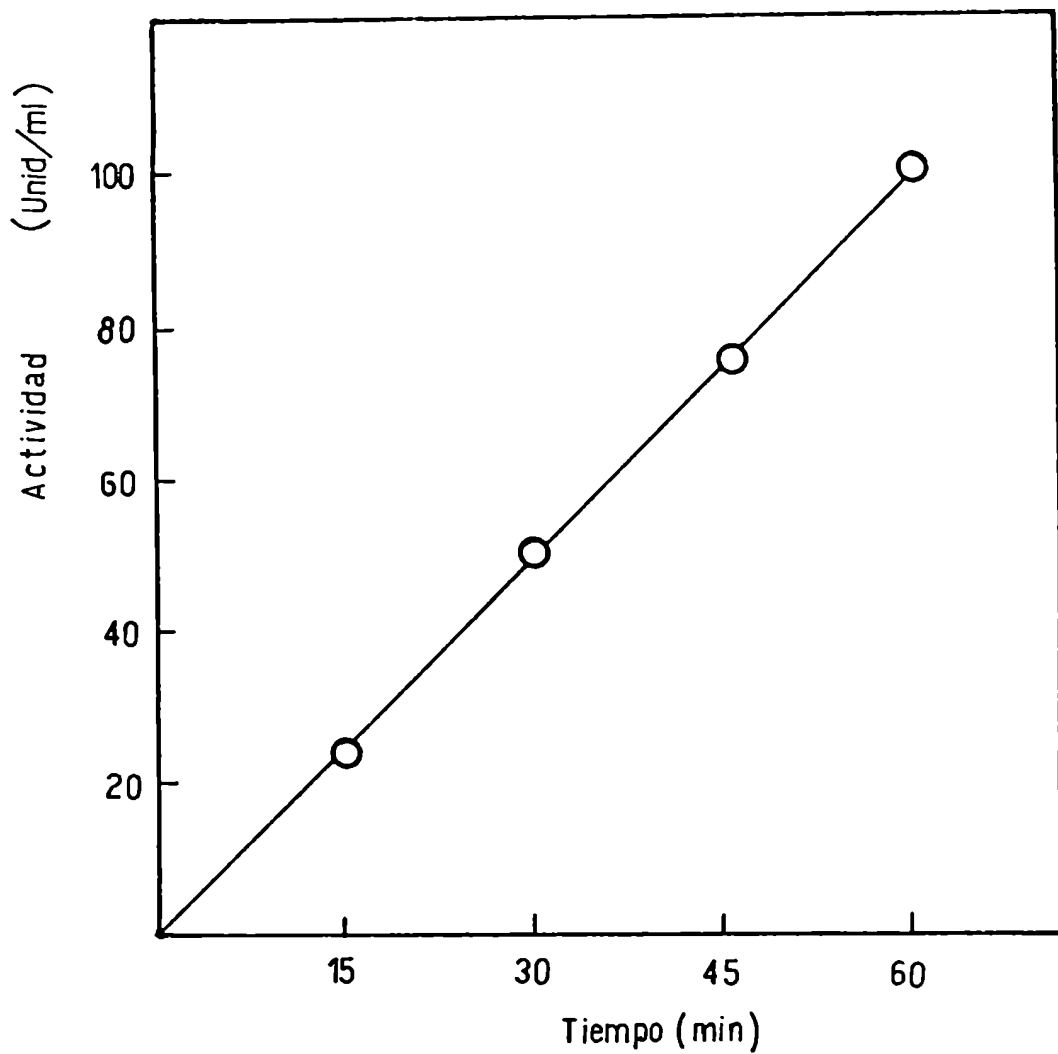


FIGURA I.2.: Tiempo óptimo de incubación. La determinación de actividad se realizó según se describe en Materiales y Métodos. Se utilizaron callos viejos crecidos durante 14 días en oscuridad.

### I.2.3. pH óptimo de incubación

Se investigó el efecto del pH de incubación sobre la actividad de rodenasa. Para ello se utilizó buffer Tris-ClH 0,05 M de pH variable entre 7,5 y 9,5. Debido a la cupla formada entre cianuro y Tris, los pH's reales de incubación variaron entre

8,4 y 9,6. La máxima actividad se obtuvo para un pH de incubación de 8,5 (Figura I.3.) que se logró empleando buffer Tris-ClH 0,05 M pH 8,7.

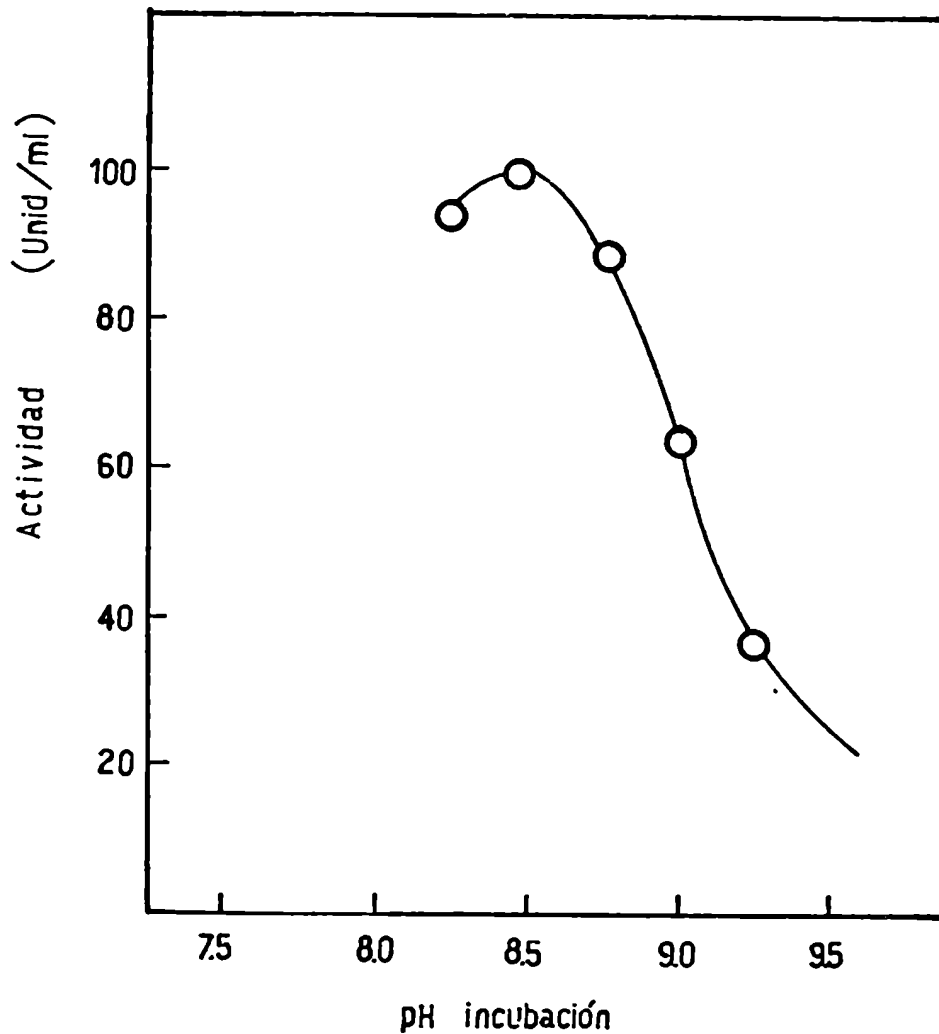


FIGURA I.3.: pH óptimo de incubación. La determinación de actividad se realizó según se describe en Materiales y Métodos. Se utilizaron callos viejos crecidos 14 días en oscuridad.

#### 1.2.4. Concentración óptima de proteína

Se estudió la variación de la actividad enzimática con cantidades crecientes de proteína (Figura I.4.). Se encontró una relación lineal entre el producto formado y la proteína a-

gregada al sistema de incubación.

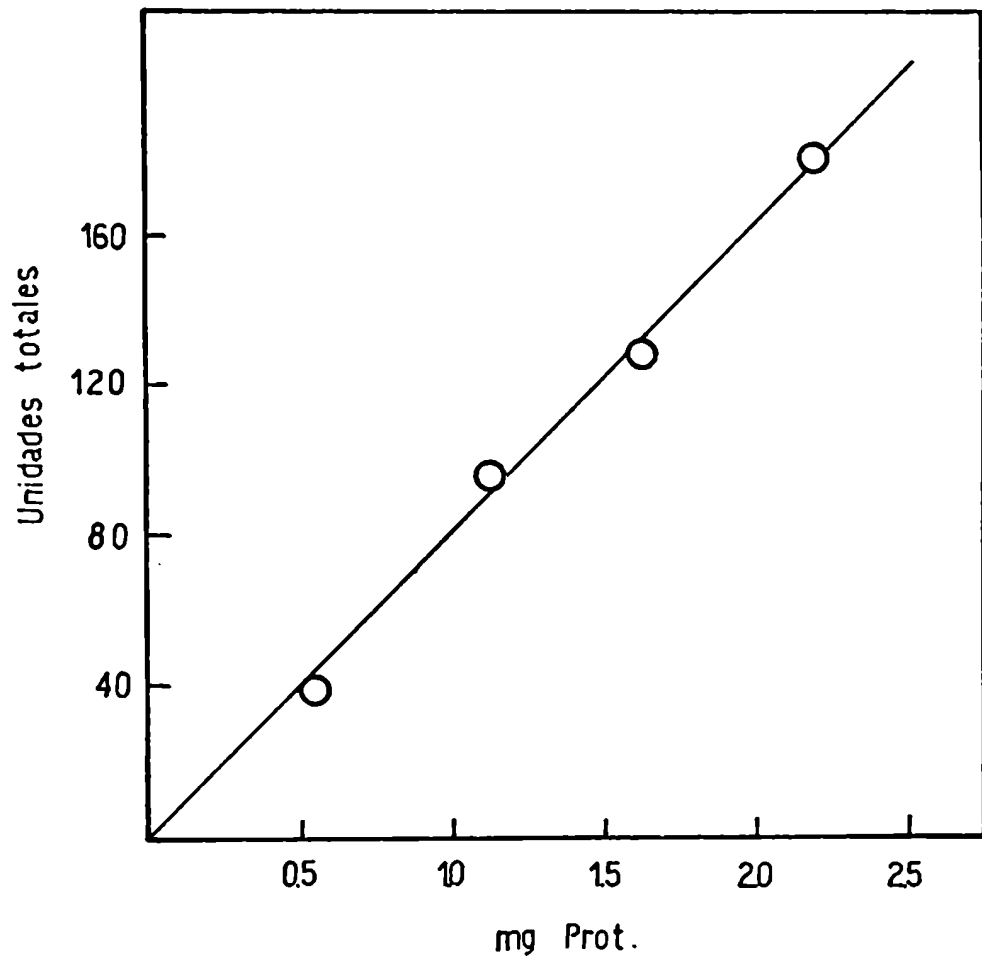


FIGURA I.4.: Concentración óptima de proteína enzimática.  
La actividad se determinó según se detalla en Materiales y Métodos. Se utilizaron callos viejos crecidos durante 14 días en oscuridad.



### I.3. BIOSINTESIS DE PORFIRINAS EN CULTIVOS DE CALLO DE SOYA

#### I.3.1. Niveles de Suc.CoA-S, cistationasa, rodenasa, ALA-S y ALA-D en clones de diferente edad

Se investigaron los niveles de actividad de las enzimas Suc.CoA-S, cistationasa, rodenasa, ALA-S y ALA-D en cultivos de callos jóvenes (34 - 36 subcultivos) y viejos (405 - 407 subcultivos).

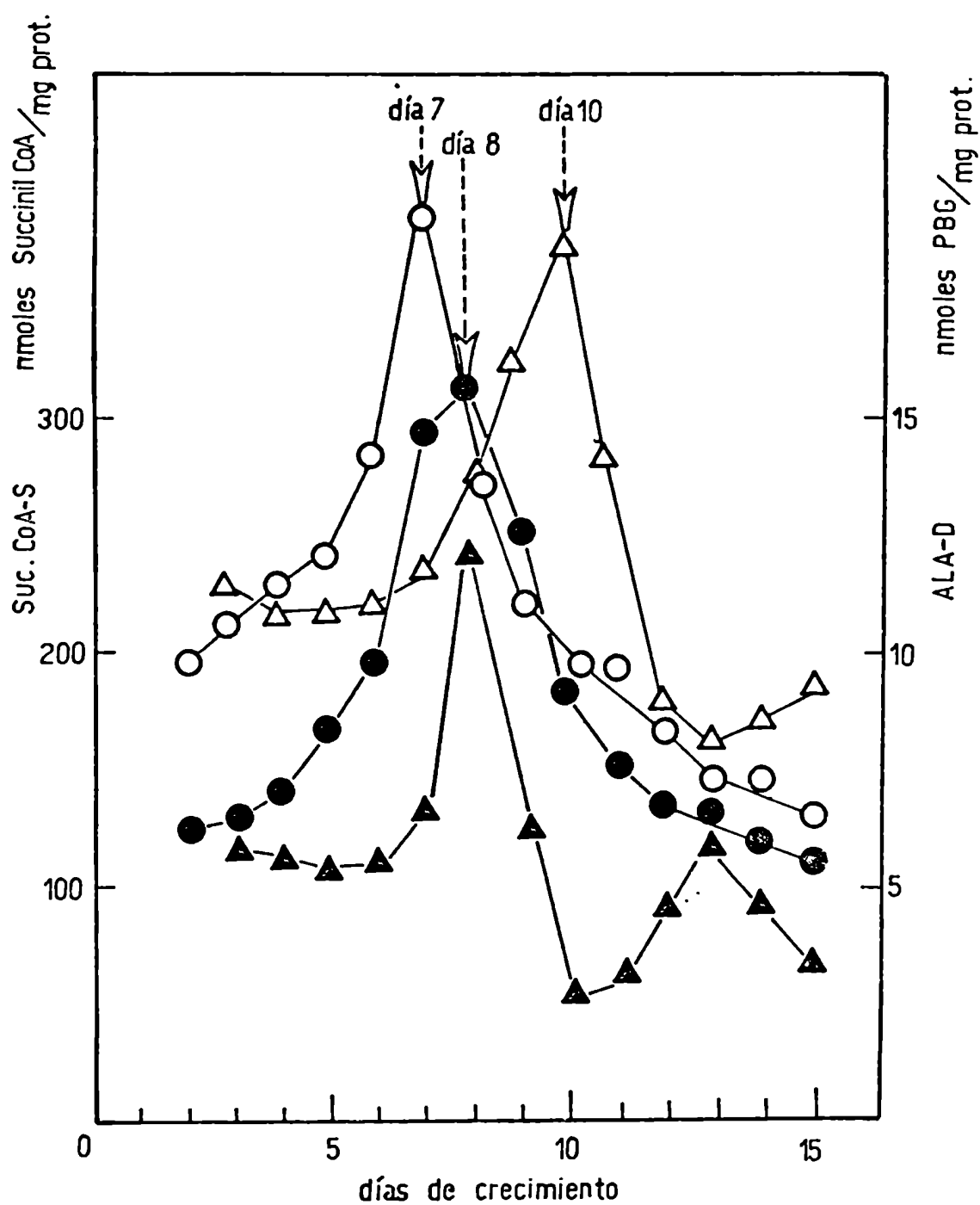
En la Figura I.5. puede apreciarse que las actividades de las enzimas Suc.CoA-S y ALA-D resultaron menores en callos viejos que en jóvenes, observándose además, en ambas cepas una significativa variación de las actividades en función de los días de crecimiento del tejido; Suc. CoA-S alcanzó su máximo en los días 7° y 8° para callos jóvenes y viejos respectivamente, mientras que las actividades de ALA-D en esos tejidos fue más alta en los días 10° y 8° de crecimiento. En callos jóvenes para las dos enzimas, el máximo no mostraba aparentemente ninguna correlación; sin embargo los máximos para callos viejos eran coincidentes, lo cual podría sugerir que estarían relacionados en alguna medida con el contenido de ALA de la célula.

Cuando se midieron cistationasa y rodenasa en diferentes días de crecimiento, se comprobó (Figura I.6.) que la actividad de estas enzimas era mayor en callos viejos. Una posible explicación para este fenómeno sería que el metabolismo de sulfocompuestos estaría relacionado con el proceso de envejecimiento del tejido producido por cultivo prolongado de la cepa; esta hipótesis estaría avalada por el aumento detectado de las actividades de cistationasa y rodenasa mientras los clones de callos envejecían fisiológicamente.

Para rodenasa se encontró un máximo de actividad el 8° día de crecimiento en cepas viejas y jóvenes, mientras que cistationasa alcanzó su pico en los días 9° y 7° en callos viejos y jóvenes respectivamente.

Un hallazgo muy interesante en todos los tejidos ensayados fue que las actividades de estas enzimas, involucradas en el metabolismo del azufre mostraban un mínimo de actividad el día 11° de crecimiento mientras que ALA-S alcanzaba su máximo muy agudo ese mismo día (Figura I.7.) aunque, como era de espe-

rar, ALA-S era más activa en callos jóvenes.



**FIGURA 1.5.:** Variación de las actividades de Suc.CoA-S ( $\circ, \bullet$ ) y ALA-D ( $\Delta, \blacktriangle$ ) en callos de soya viejos ( $\bullet, \blacktriangle$ ) y jóvenes ( $\circ, \Delta$ ) respectivamente en función de los días de crecimiento. Cada punto representa el promedio de tres experiencias distintas con triplicado de las muestras. Las actividades enzimáticas y contenido de proteínas se determinaron de acuerdo a Materiales y Métodos.

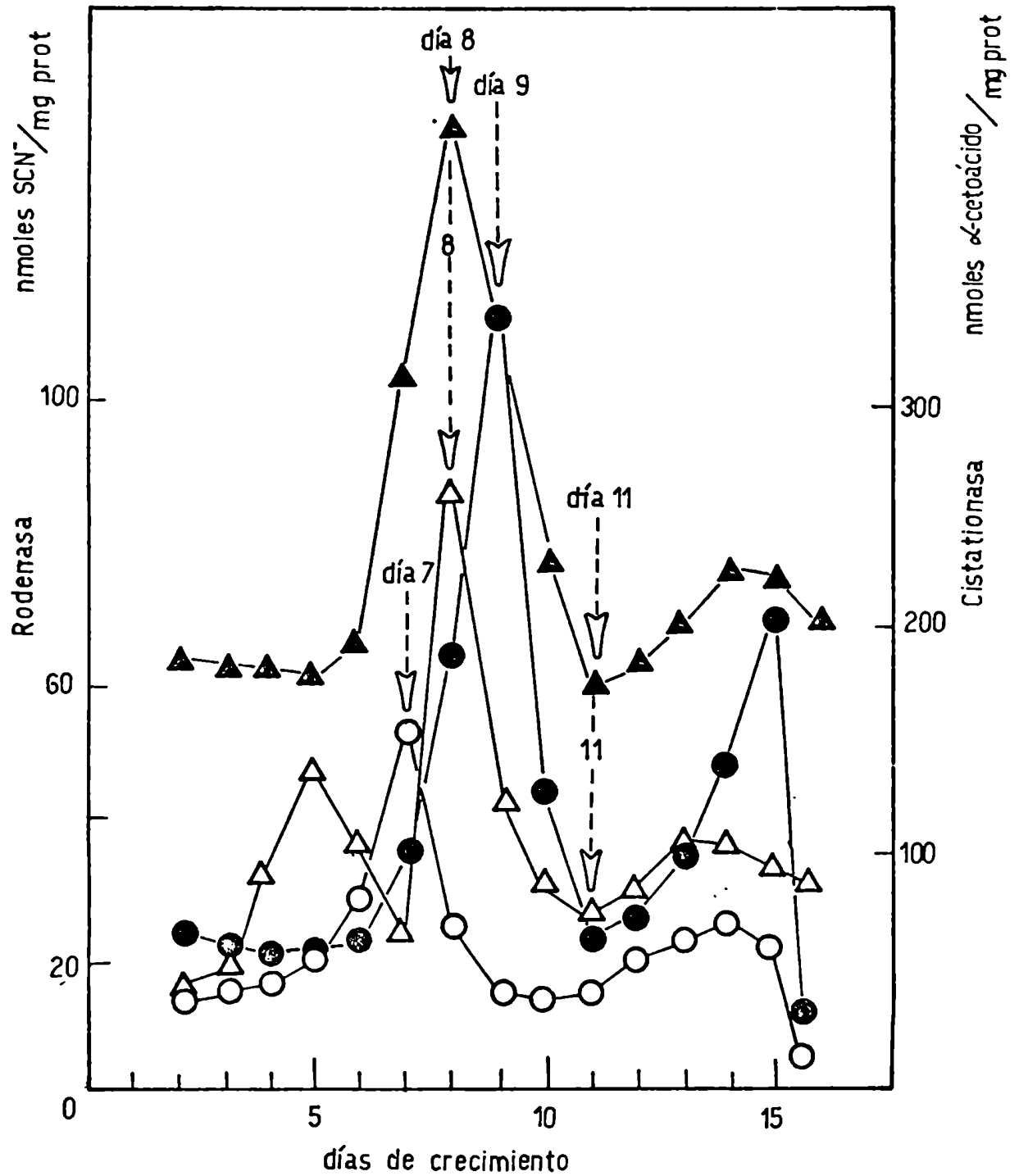
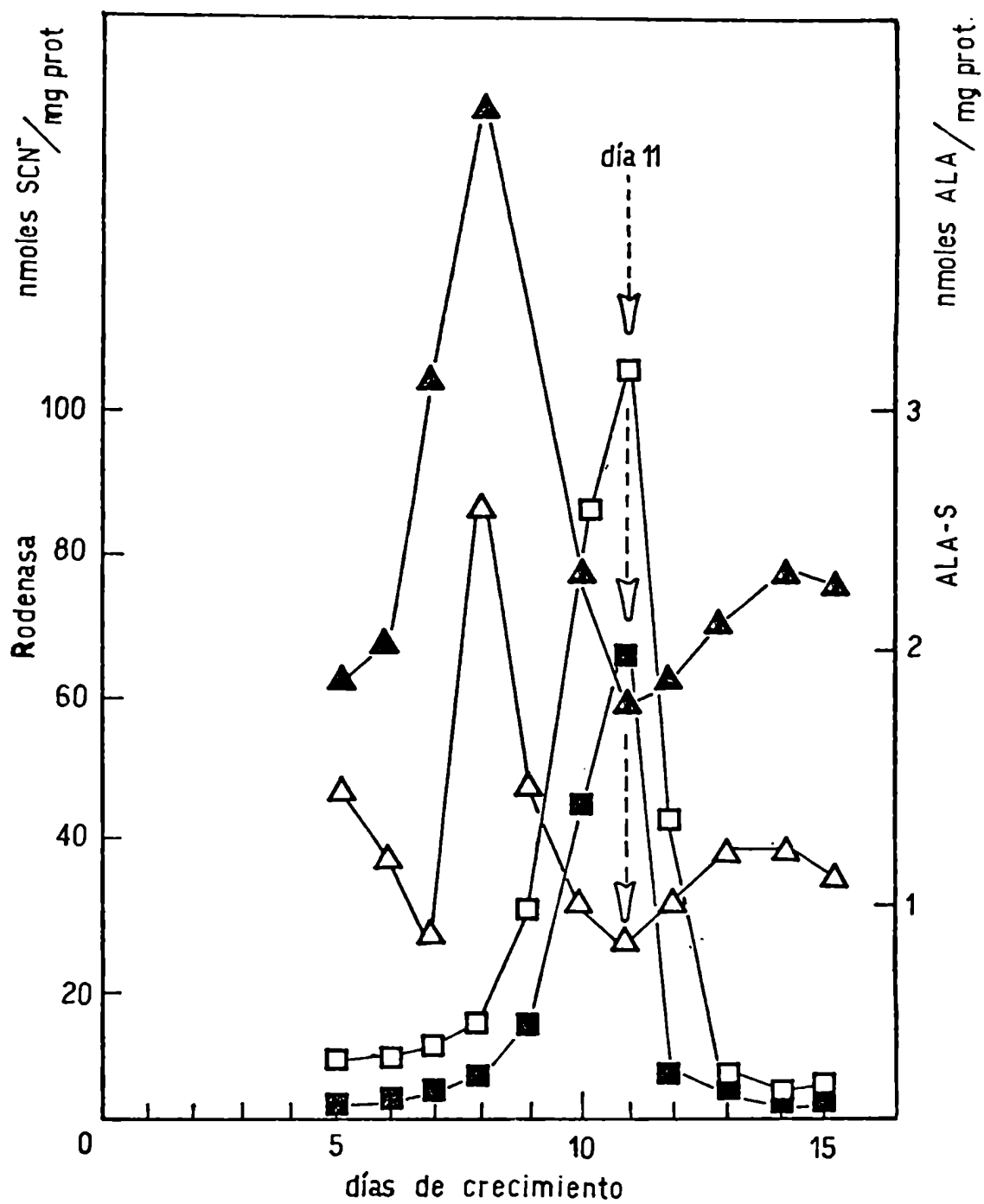


FIGURA I.6.: Variación de las actividades de cistationasa ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) y rodenasa ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ) en callos de soya viejos ( $\bullet$ ,  $\blacktriangle$ ) y jóvenes ( $\circ$ ,  $\Delta$ ) respectivamente, en función de los días de crecimiento. Cada punto representa el promedio de tres experiencias distintas con triplicado de las muestras. Las actividades enzimáticas y contenido de proteínas se determinaron de acuerdo a Materiales y Métodos.



**FIGURA I.7.:** Variación de las actividades de rodanasa ( $\Delta, \blacktriangle$ ) y ALA-S ( $\square, \blacksquare$ ) en callos de soya viejos ( $\blacktriangle, \blacksquare$ ) y jóvenes ( $\Delta, \square$ ) respectivamente, en función de los días de crecimiento. Cada punto representa el promedio de tres experiencias distintas con triplicado de las muestras. Las actividades enzimáticas y contenido de proteínas se determinaron de acuerdo a Materiales y Métodos.

Estos resultados parecerían indicar que en callos de soya podría operar un esquema similar al propuesto por Wider de Xifra y col (1976) para el control de ALA-S de *Rp. spheroides*. Sin embargo, considerando que los niveles de actividad de cistationasa fueron mucho más altos que los de rodenasa, podemos postular además que el contenido de un sulfocompuesto regulador de la actividad de ALA-S sería controlado probablemente a través de su degradación por rodenasa. Si esta hipótesis es válida, un valor mínimo de actividad de rodenasa se correspondería con un máximo para ALA-S.

En algunos experimentos preliminares se encontró que el ALA-S de callos viejos era activada por trisulfocistina, apoyando así la hipótesis que los polisulfocompuestos pueden estar involucrados en la regulación de esta enzima, en células cultivadas de soya.

Finalmente, es importante destacar que estos hallazgos han confirmado trabajos anteriores indicando que en tejidos que se mantienen por repiques continuos ocurren cambios metabólicos después de cultivos prolongados; en este caso se encontró que a medida que aumenta el tiempo durante el cual el callo se mantiene por sucesivos repiques, disminuye su capacidad para sintetizar las enzimas involucradas en la biosíntesis de porfirinas y por el contrario aumenta la capacidad de síntesis de las enzimas responsables del metabolismo del azufre.

Por lo tanto, cuando se trabaja con cultivos de tejidos de plantas es importante establecer la edad del cultivo y si es posible realizar estudios comparativos en clones de diferente edad.

#### I.4. CONCLUSIONES

- Se determinaron las condiciones óptimas para la medición de actividad de rodenasa en cultivos de callos de soya.
- Se midieron actividades de Suc.CoA-S, ALA-S, ALA-D, rodenasa y cistationasa en callos viejos y jóvenes y se investigó la variación de dichas actividades en función de los días de crecimiento del tejido.

- Las enzimas del camino biosintético de las porfirinas presentaron mayor actividad en tejidos jóvenes que en viejos, mientras que para las enzimas involucradas en el metabolismo de sulfocompuestos se halló un comportamiento opuesto.
- Se comprobó que en el caso de rodenasa y ALA-S existía una relación inversa en sus actividades ya que, en el día 11° de crecimiento del tejido, altas actividades de ALA-S se correspondían con bajos niveles de rodenasa.
- En base a los resultados hallados se postula que en este tejido operaría un mecanismo de regulación similar al propuesto para *Rp. spheroides* que vincula el metabolismo de polisulfoderivados con el de las porfirinas.

## REFERENCIAS

- Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A.M. del C. & Tigier, H.A.  
(1971) Biochim. Biophys. Acta 235, 511.
- Wider de Xifra, E.A.; Sandy, J.D.; Davies, R. & Neuberger, A.  
(1976) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 273, 79.

## CAPITULO II

### RODENASA DE *Rp. palustris*

---

	Página
II.1. Condiciones óptimas de extracción de la proteína enzimática	255
II.1.1. Tiempo e intensidad de sonicación	255
II.1.2. Buffer de extracción	256
II.2. Actividad de rodenasa en distintas fracciones	258
II.2.1. Estabilidad de la fracción sobrenadante	259
II.3. Purificación	260
II.3.1. Ensayos preliminares	260
II.3.2. Esquema de purificación	265
II.4. Determinación del peso molecular	268
II.5. Inmovilización de rodenasa sobre gel de Sepharosa 4B	269
II.5.1. Condición fundamental: Requerimiento de tiosulfato de sodio	269
II.5.2. Estabilidad del complejo gel-enzima (G-E-S)	270
II.5.2.1. En función del tiempo de estacionamiento	270
II.5.2.2. En función del uso repetido	270
II.6. Estudio comparativo de las propiedades de la enzima soluble e inmovilizada	273
II.6.1. Tiempo óptimo de incubación	273
II.6.2. Temperatura óptima de incubación	273
II.6.3. pH óptimo de incubación	273
II.6.4. Concentración óptima de proteína	277



	Página
II.7. Estudios cinéticos	278
II.7.1. Comportamiento cinético de la rodensa <u>soluble</u>	278
II.7.1.1. Interacción con sus su <u>tra</u> tos	278
II.7.1.2. Interacción con sus pro <u>ductos</u>	279
II.7.2. Comportamiento cinético de la enzima insolubilizada	283
II.7.2.1. Interacción con sus su <u>stra</u> tos	283
II.8. Mecanismo químico de la rodenasa	290
II.8.1. Interacción de la rodenasa inmoviliza <u>da</u> con sus sustratos	290
II.8.2. Interacción de la rodenasa inmoviliza <u>da</u> con sus productos	295
II.9. Interacción de la rodenasa con distintas enzi <u>mas</u>	300
II.9.1. Interacción entre rodenasa y ALA-S	301
II.9.2. Interacción entre rodenasa y ALA-D	304
II.9.3. Interacción entre rodenasa y M-DH	310
II.10. Conclusiones	316
Referencias	318

## II. RODENASA DE *Rp. palustris*

Los niveles de ALA-S en *Rp. palustris*, análogamente a lo que ocurre en *Rp. spheroides* (Neuberger y col, 1973), varían significativamente cuando se la aisla de cultivos crecidos anaeróbicamente a la luz o aeróbicamente en la oscuridad (Viale y col, 1980).

Si bien los mecanismos de regulación postulados para ALA-S en *Rp. spheroides* (Wider de Xifra y col, 1976) difieren en algunos aspectos de los propuestos por Viale y col (1980) para *Rp. palustris*, se acepta también en este tejido, la existencia de grupos sulfhidrilos sobre la enzima y que la modificación de los mismos debe desempeñar un papel importante en el control de su actividad.

Wider de Xifra y col (1976) asignaron a la rodenasa de *Rp. spheroides* un rol fundamental en dicho proceso de regulación.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se decidió efectuar un estudio para determinar las condiciones óptimas que permitieran medir y posteriormente caracterizar la rodenasa de *Rp. palustris*.

### II.1. CONDICIONES OPTIMAS DE EXTRACCION DE LA PROTEINA ENZIMATICA

#### II.1.1. Tiempo e intensidad de sonicación

Las células cosechadas se resuspendieron en buffer fosfato 0,05 M pH 7,3 y se sonicaron a distintas intensidades durante diferentes tiempos. A continuación el tejido se centrifugó a 25.000 x g 30 minutos obteniéndose una fracción sobrenadante y un precipitado (pellet). A cada uno de ellos se les determinó actividad enzimática y contenido de proteínas. La Figura II.1. muestra los resultados obtenidos para el sobrenadante (Figura II.1.A) y el pellet (Figura II.1.B.).

En base a estos resultados se eligió como intensidad de sonicación 8 micrones y como tiempo 30 segundos ya que a 60 segundos la actividad específica era mucho menor y, si bien a

una intensidad de 22 micrones los valores de actividad específica coincidían, se producía mucha turbulencia. Estas condiciones se utilizaron en todas las experiencias posteriores.

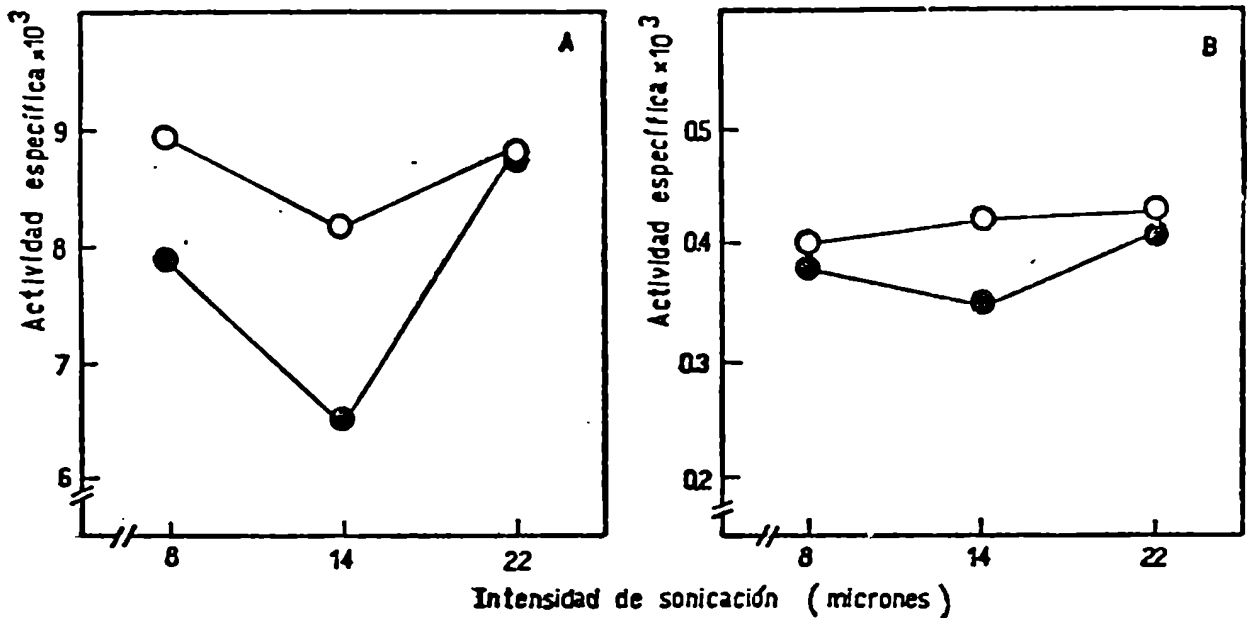


FIGURA II.1.: Efecto del tiempo e intensidad de sonicación sobre la actividad específica de rodenasa en el sobrenadante (A) y pellet (B) de 25.000 x g. ○ 30 segundos; ● 60 segundos. La actividad específica se determinó de acuerdo a los procedimientos detallados en Materiales y Métodos.

### II.1.2. Buffer de extracción

Las células cosechadas se resuspendieron en los siguientes buffers de concentración 0,05 M: Tris-ClH o fosfato de sodio pH 7,7 y pH 7,3. Se centrifugaron a 25.000 x g durante 30 minutos ensayándose actividad y proteínas en los respectivos sobrenadantes. La Tabla II.1. muestra las actividades específicas obtenidas en cada caso.

Considerando los datos obtenidos se decidió utilizar como buffer de extracción fosfato de sodio 0,05 M pH 7,3.

TABLA II.1.: Buffer óptimo de extracción

Buffer	U/ml x 10 <sup>3</sup>	mg Prot/ml	Actividad Específica x 10 <sup>3</sup>
Tris-ClH pH 7,7	5,30	0,70	7,57
Tris-ClH pH 7,3	11,18	1,24	9,02
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> pH 7,7	13,13	1,35	7,73
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> pH 7,3	11,90	1,12	10,63

La determinación de actividad específica se realizó de acuerdo a los procedimientos descritos en Materiales y Métodos.

## II.2. ACTIVIDAD DE RODENASA EN DISTINTAS FRACCIONES

Se determinó actividad enzimática en las distintas fracciones obtenidas luego de sonicar las células y centrifugar el extracto crudo durante 30 minutos a 25.000 x g. Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla II.2.

TABLA II.2.: Actividad de rodenasa en distintas fracciones

FRACCION	% ACTIVIDAD
Extracto crudo	100
Sobrenadante 25.000 x g	40-70
Pellet 25.000 x g	5

La determinación de actividad enzimática se efectuó según se describe en Materiales y Métodos.

Como la actividad detectada en pellet, en varias experiencias, fue siempre del orden del 5% de la actividad total, se decidió continuar todos los estudios con la fracción sobrenadante de 25.000 x g.

En todos los procesos de purificación encarados, se observó una notable variación en el rendimiento de unidades de la fracción sobrenadante 25.000 x g, sugiriendo esto, tal vez, la existencia de algún compuesto con propiedades activantes de gran labilidad.

### II.2.1. Estabilidad de la fracción sobrenadante

Se estudió la estabilidad de la enzima en la fracción sobrenadante de 25.000 x g durante el estacionamiento a -20 °C.

La Figura II.2. muestra que la enzima mantiene un 84% de su actividad en un período de un mes y un 78% luego de 57 días, concluyéndose que la enzima es muy estable.

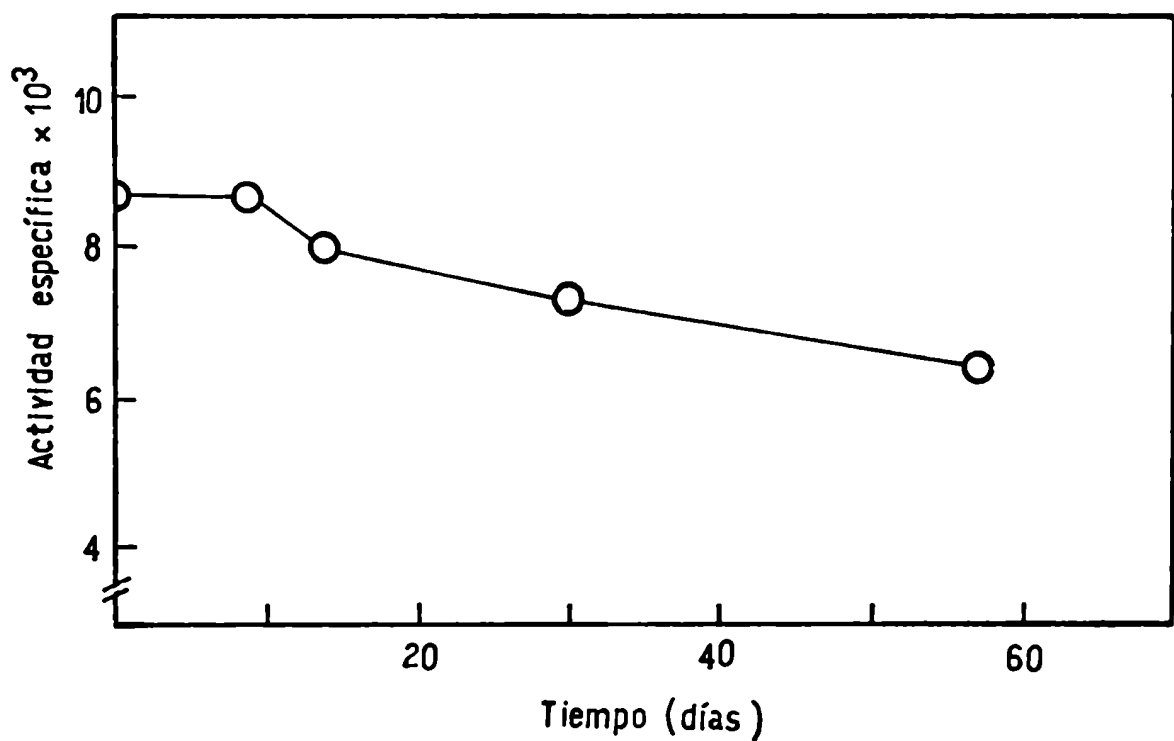


FIGURA II.2.: Estabilidad de la fracción sobrenadante de 25.000 x g. Las mediciones se realizaron de acuerdo con los métodos descritos en Materiales y Métodos.

## II.3. PURIFICACION

### II.3.1. Ensayos preliminares

#### - Centrifugación diferencial

El sobrenadante de 25.000 x g se sometió a una ultracentrifugación durante 1 hora a 140.000 x g. En la Figura II.3. se pueden observar los resultados obtenidos.

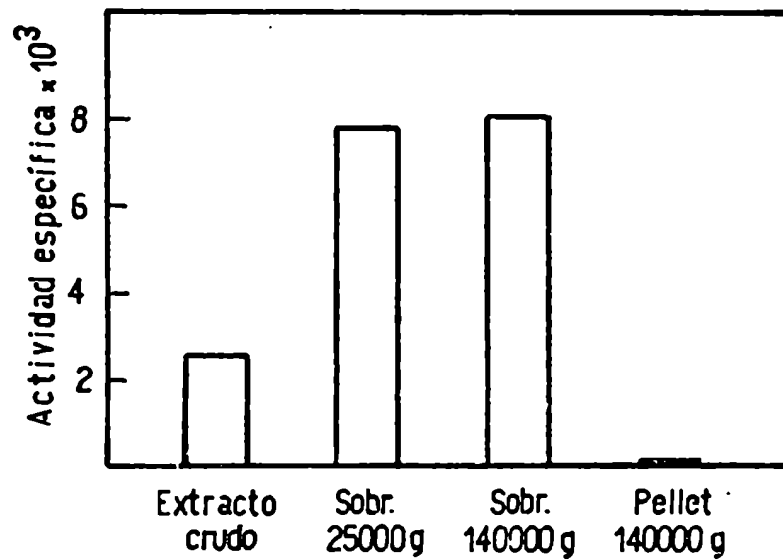


FIGURA II.3.: Centrifugación diferencial de rodenasa. Los procedimientos utilizados fueron los detallados en Materiales y Métodos.

Como no se obtuvo una purificación significativa se decidió utilizar el sobrenadante de 25.000 x g para la siguiente etapa, sin incorporar la centrifugación a 140.000 x g como etapa adicional en el esquema final de purificación.

#### - Fraccionamiento con sulfato de amonio

El sobrenadante de 25.000 x g se fraccionó con sulfato de amonio; en la Figura II.4. se grafican los datos obtenidos.

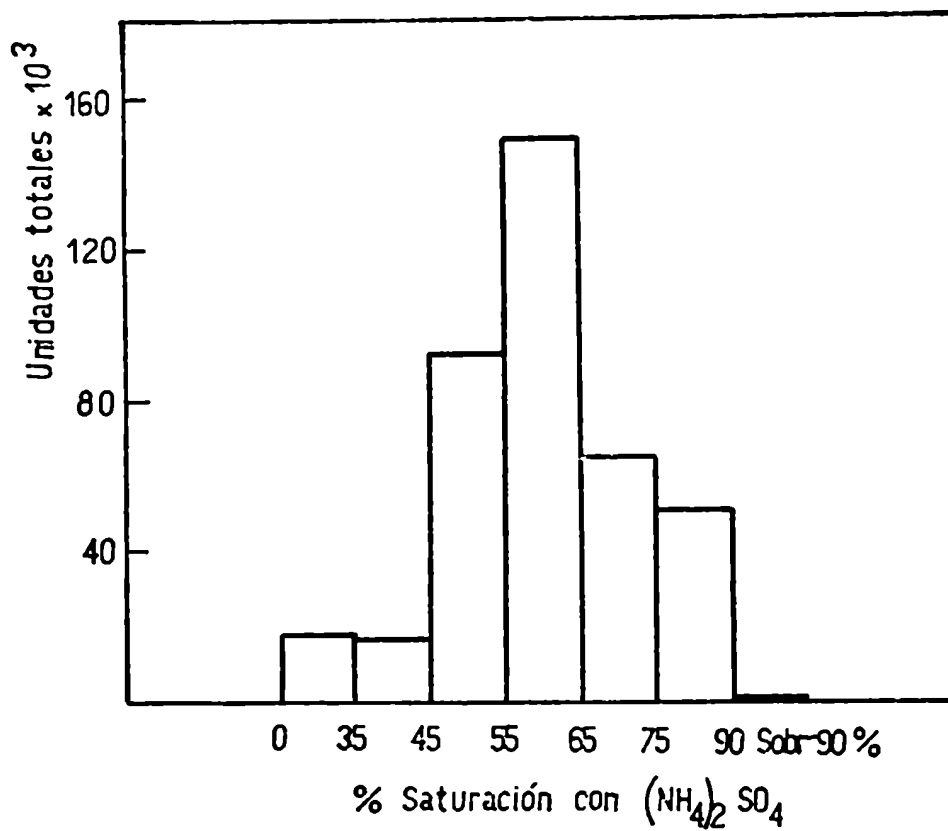


FIGURA II.4.: Fraccionamiento con sulfato de amonio.  
 Las mediciones de actividad se efectuaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

En la fracción 45-65% se obtuvo el mayor porcentaje de actividad con una purificación de 8 veces, eligiéndose este rango de fraccionamiento para un posterior procesamiento.

En todas las determinaciones de actividad de las fracciones obtenidas luego de la precipitación con sulfato de amonio, fue necesario eliminar la inhibición producida por el ion amonio, mediante el pasaje de las soluciones a través de una columna de Sephadex G-25.



- Filtración por tamiz molecular

La fracción precipitada con sulfato de amonio entre 45-65% de saturación se sembró en una columna de Sephadex G-100 y se eluyó con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,4 con un flujo de 35 ml por hora.

El eluido se recogió en fracciones de 2,5 ml determinándose en cada una de ellas la actividad específica de rodenasa.

La Figura II.5. muestra la curva de elución correspondiente.

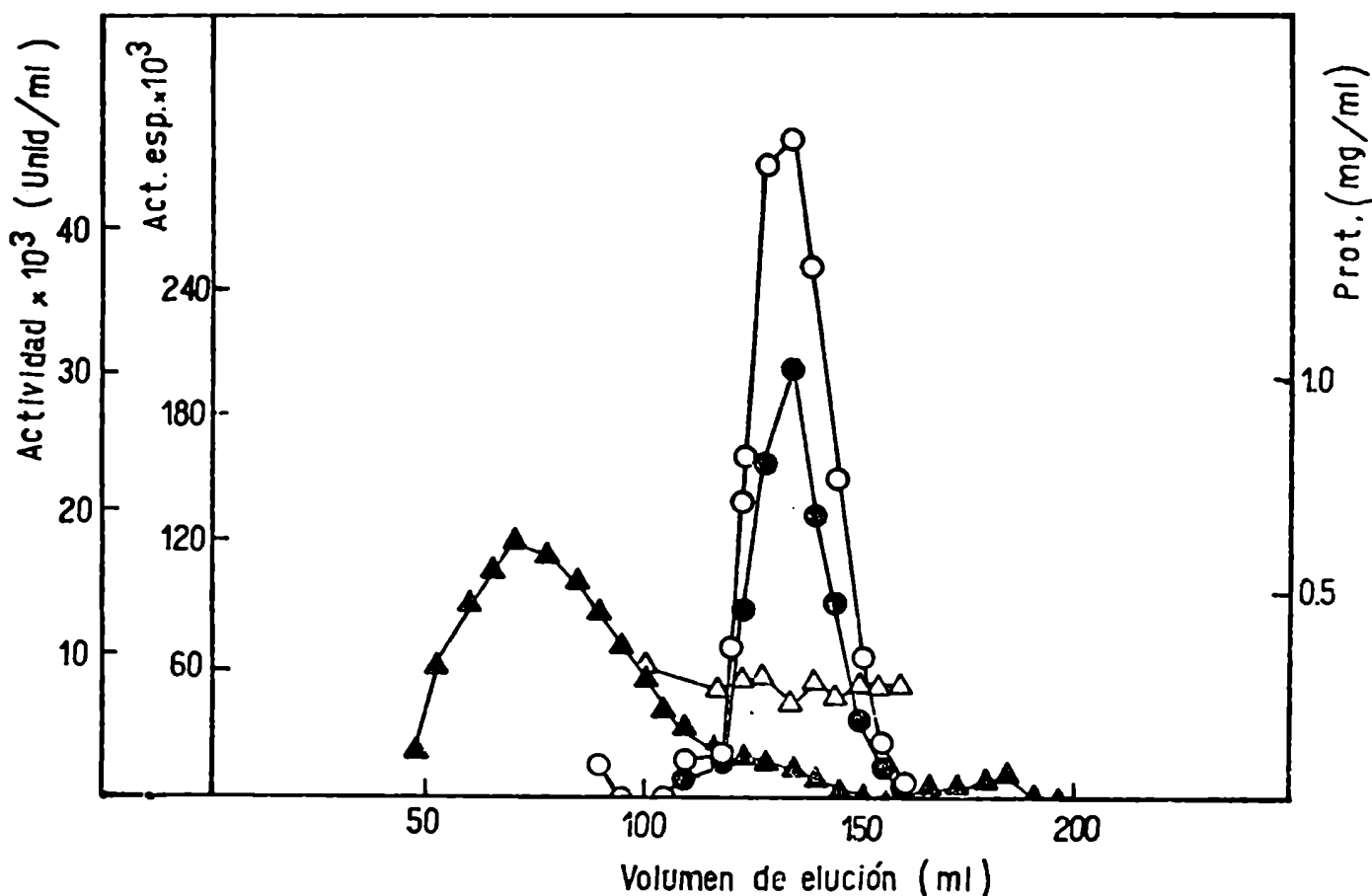


FIGURA II.5.: Cromatografía por Sephadex G-100.  
 ○ Unid/ml; ● Act. Esp.;  
 △ mg prot/ml por Lowry (1951); ▲ mg prot/ml  
 por Warburg y Christian (1941). Las condi-  
 ciones experimentales son las descritas en Mate-  
 riales y Métodos.

Las fracciones con elevada actividad de rodenasa se concentraron por precipitación con sulfato de amonio entre 0-65% de saturación.

La enzima se purificó 7,6 veces respecto a la fracción 45-65%, con un rendimiento del 15% (Tabla II.3.).

TABLA II.3.: Cuadro de purificación por tamiz molecular

FRACCION	VOL.	U/ml x 10 <sup>3</sup>	U <sub>T</sub> x 10 <sup>3</sup>	mg PROT/ml	mg PROT <sub>T</sub>	ACT.ESP. x 10 <sup>3</sup>	PURIF.	REND.%
Siembra (45-65%)	5,8	75,40	437,30	3,60	22,04	19,84	1,0	100
0-65%	4,0	16,55	66,20	0,11	0,44	150,45	7,6	15

La metodología empleada es la descrita en Materiales y Métodos.

En todos los casos en los que se utilizó tamiz molecular, las fracciones eluidas perdían rápidamente actividad por estacionamiento a 4 °C. Por lo tanto se decidió no incluir esta etapa en el proceso final de purificación.

#### - Efecto del calentamiento

Se investigó el efecto del calentamiento a distintos tiempos y temperaturas sobre la fracción 45-65% de saturación con sulfato de amonio, previamente desalada por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25.

En la Figura II.6. se observan las curvas obtenidas por calentamiento a 50 °C, 60 °C y 70 °C durante 10, 20 y 30 minutos.

La misma fracción se calentó durante 15 minutos a mayores temperaturas (Figura II.7.).

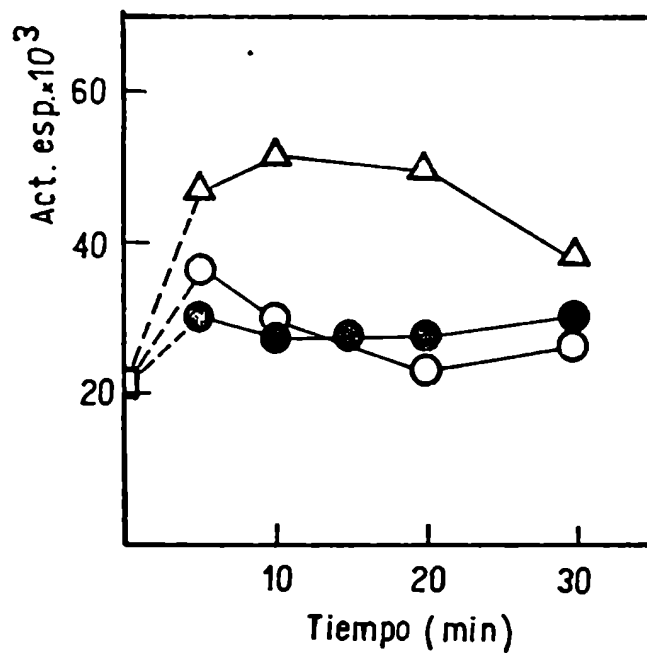


FIGURA II.6.: Curva de calentamiento.  
 ○ 50 °C; ● 60 °C;  
 △ 70 °C.  
 □ Actividad inicial de la fracción 45-65%. La metodología empleada se describió en Materiales y Métodos.

En ambos casos luego de transcurrido el período de calentamiento, las distintas preparaciones se enfriaron a 0 °C y se centrifugaron inmediatamente durante 30 minutos a 25.000 x g.

Considerando los datos obtenidos, se decidió incluir un calentamiento de 15 minutos a 70 °C como etapa final en el proceso de purificación de rodenasa.

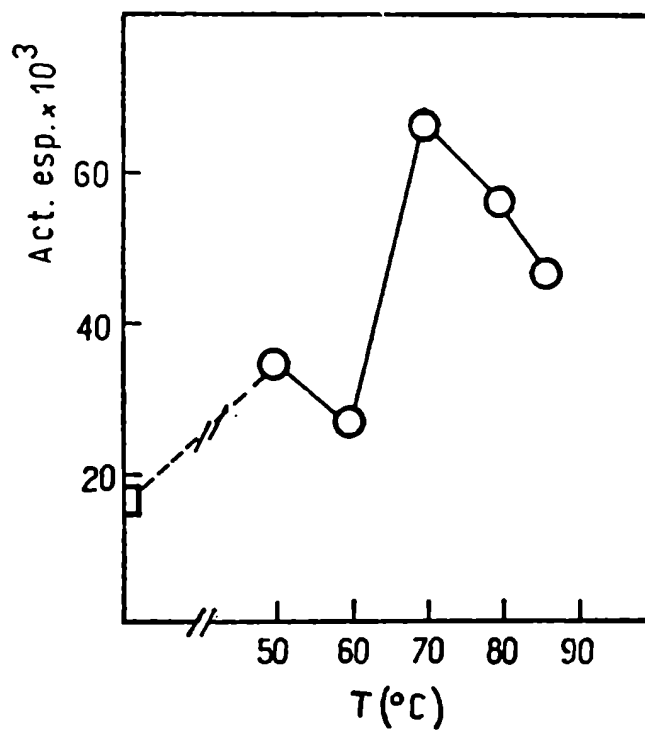
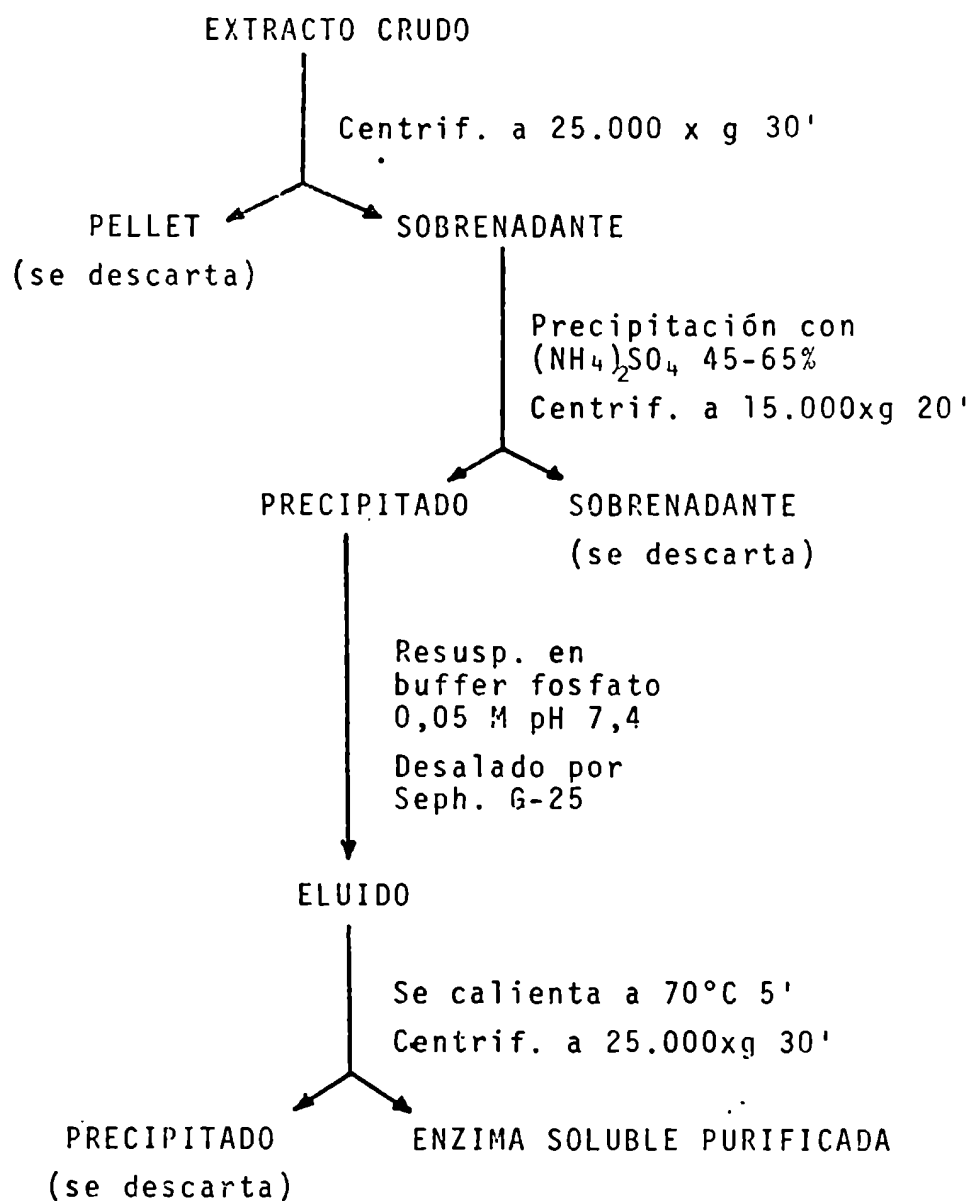


FIGURA II.7.: Curva de calentamiento.

El tiempo de calentamiento fue de 15 minutos. □ Actividad inicial de la fracción 45-65%. El procedimiento seguido para la medición de actividad enzimática se detalló en Materiales y Métodos.

### II.3.2. Esquema de purificación

En base a los resultados de todos los ensayos preliminares efectuados, se decidió adoptar como proceso de purificación, el esquema que se detalla a continuación.



Esquema de purificación de rodenasa aislada de *Rp. palustris*

En la Tabla II.4. se muestran los resultados obtenidos siguiendo el esquema de purificación adoptado.

Se obtuvo una preparación de la enzima soluble purificada 24 veces con un rendimiento final del 11%.

TABLA II.4.: Cuadro de purificación de rodenasa de *Rp. palustris*

FRACCION	$U_T \times 10^3$	mg $PROT_T$	ACT. ESP. $\times 10^3$	PURIF.	REND. Respecto etapa anterior	REND. FINAL
					%	%
Extracto crudo	769	272,25	2,63	1,00	100,0	100
Sobrenadante 25.000xg	276	44,10	6,26	2,40	36,0	36
$(NH_4)_2SO_4$ 45-65%	181	9,12	19,86	7,55	66,0	24
Calentamiento 70 °C 5'	86	1,36	63,24	24,00	47,5	11

Las condiciones experimentales fueron las descriptas en el texto y en Materiales y Métodos.

#### II.4. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR:

El peso molecular (PM) se determinó por cromatografía a través de Sephadex G-100 de la fracción precipitada con sulfato de amonio entre 45-65% de saturación, usando buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,4 para la elución de la proteína.

Se obtuvo un único pico de PM  $16.500 \pm 1.600$  (Figura II.8.).

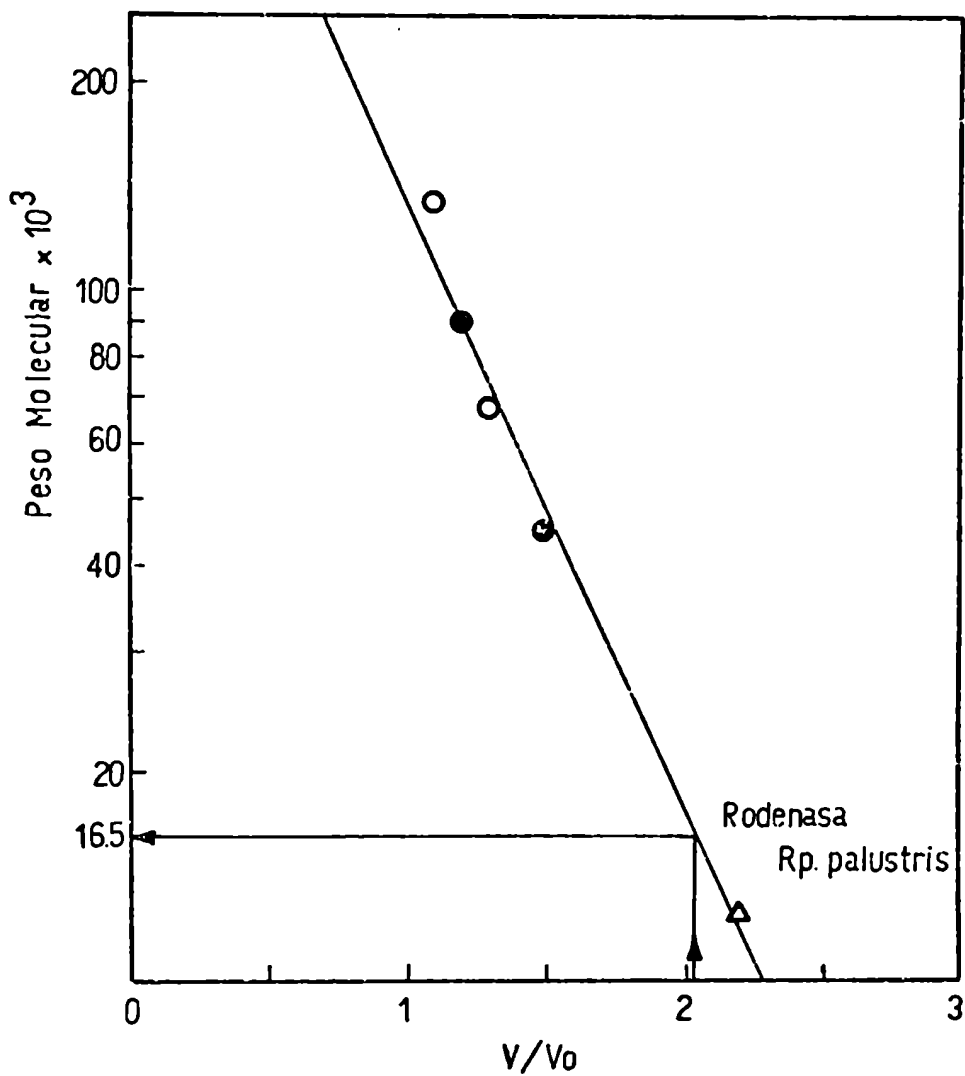


FIGURA II.8.: Determinación de PM por Sephadex G-100. Las dimensiones de la columna y las condiciones de elución son las descritas en Materiales y Métodos. Para la calibración de la columna se emplearon las siguientes proteínas: blue-dextrano, seroalbúmina (○), ovoalbúmina (●) y citocromo (△).

## II.5. INMOVILIZACION DE RODENASA SOBRE GEL DE SEPHAROSA 4B

### II.5.1. Condición fundamental: Requerimiento de tiosulfato de sodio

En las primeras experiencias de inmovilización de la enzima sobre geles de Sepharosa se obtuvo una enzima acoplada con una actividad muy baja. Por esta razón se investigó el efecto protector del tiosulfato de sodio durante el proceso de acople de la rodenasa.

En la Tabla II.5. se encuentran tabulados los datos de actividad específica hallados para la enzima soluble (E), purificada y concentrada por Amicon y para la enzima inmovilizada en ausencia y presencia de tiosulfato de sodio 1 mM (G-E y G-E-S).

TABLA II.5.:Requerimiento del tiosulfato de sodio en la inmovilización de rodenasa de *Rp. palustris*

FRACCION	UNIDADES TOTALES x 10 <sup>3</sup>	PROTEINA TOTAL (mg)	ACTIVIDAD ESPECIFICA x 10 <sup>3</sup>	RENDIMIENTO	
				A	B
				%	%
E	113,75	10,75	10,58	100,0	100,0
G-E	9,56	4,58	2,09	8,4	43,0
G-E-S	50,75	4,58	11,08	45,0	43,0

Se empleó la enzima proveniente de la última etapa de purificación, concentrada por Amicon. La inmovilización y la determinación de actividad, se efectuó según se detalló en Materiales y Métodos.

(A) Actividad enzimática recuperada en el gel; (B) proteínas acopladas al gel. E: enzima soluble concentrada; G-E: enzima inmovilizada; G-E-S: enzima inmovilizada en presencia de tiosulfato de sodio 1 mM.



De los datos anteriores se puede deducir que la enzima inmovilizada sobre gel de Sepharosa en presencia de tiosulfato de sodio presenta una actividad mucho mayor que cuando la inmovilización se realiza en su ausencia.

En el primer caso la actividad enzimática acoplada al gel fue del 45% mientras que sólo se recuperó un 8% de unidades cuando la inmovilización se efectuó sin tiosulfato.

Por lo tanto, en todas las experiencias posteriores se mantuvo el agregado de tiosulfato de sodio 1 mM durante el procedimiento de insolubilización.

## II.5.2. Estabilidad del complejo gel-enzima (G-E-S)

### II.5.2.1. En función del tiempo de estacionamiento

Se estudió la estabilidad del complejo G-E-S durante el estacionamiento a 4 °C y se compararon los valores obtenidos con la enzima soluble en las mismas condiciones (Figura II.9.). Se comprobó que esta última es mucho más estable que la inmovilizada, reteniendo la primera un 52% de actividad luego de 19 días, mientras que la inmovilizada retuvo sólo un 18% en el mismo lapso.

### II.5.2.2. En función del uso repetido

Se investigó la estabilidad del complejo G-E-S cuando la misma preparación era empleada más de una vez para determinar actividad enzimática.

Luego de cada incubación el complejo G-E-S centrifugado se lavó 3 veces en batch con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 8,7 + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 1 mM y el gel decantado se resuspendió al doble de su volumen, incubándose en las condiciones standard.

De los datos de la Figura II.10. se puede deducir que la enzima inmovilizada pierde un 15% de actividad luego de cada incubación. Aún así el empleo de la enzima inmovilizada es de gran utilidad ya que permite usar una misma preparación en repetidas ocasiones.

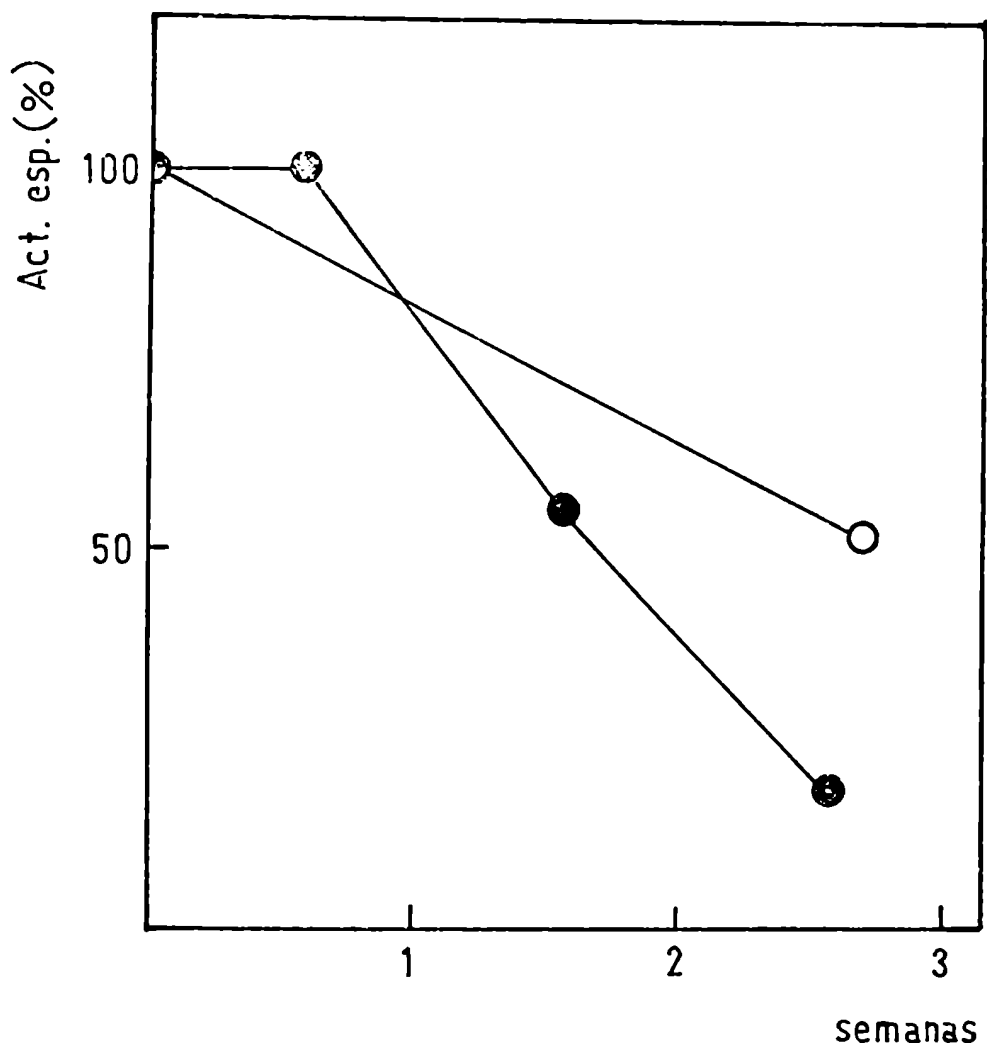


FIGURA II.9.: Modificación de la actividad de rode-nasa soluble e inmovilizada en función del tiempo.

○ Enzima soluble; ● G-E-S: enzima inmovilizada en presencia de tiosulfato 1 mM.

Las condiciones empleadas para la inmovilización y determinación de actividad enzimática se encuentran descritas en Materiales y Métodos.

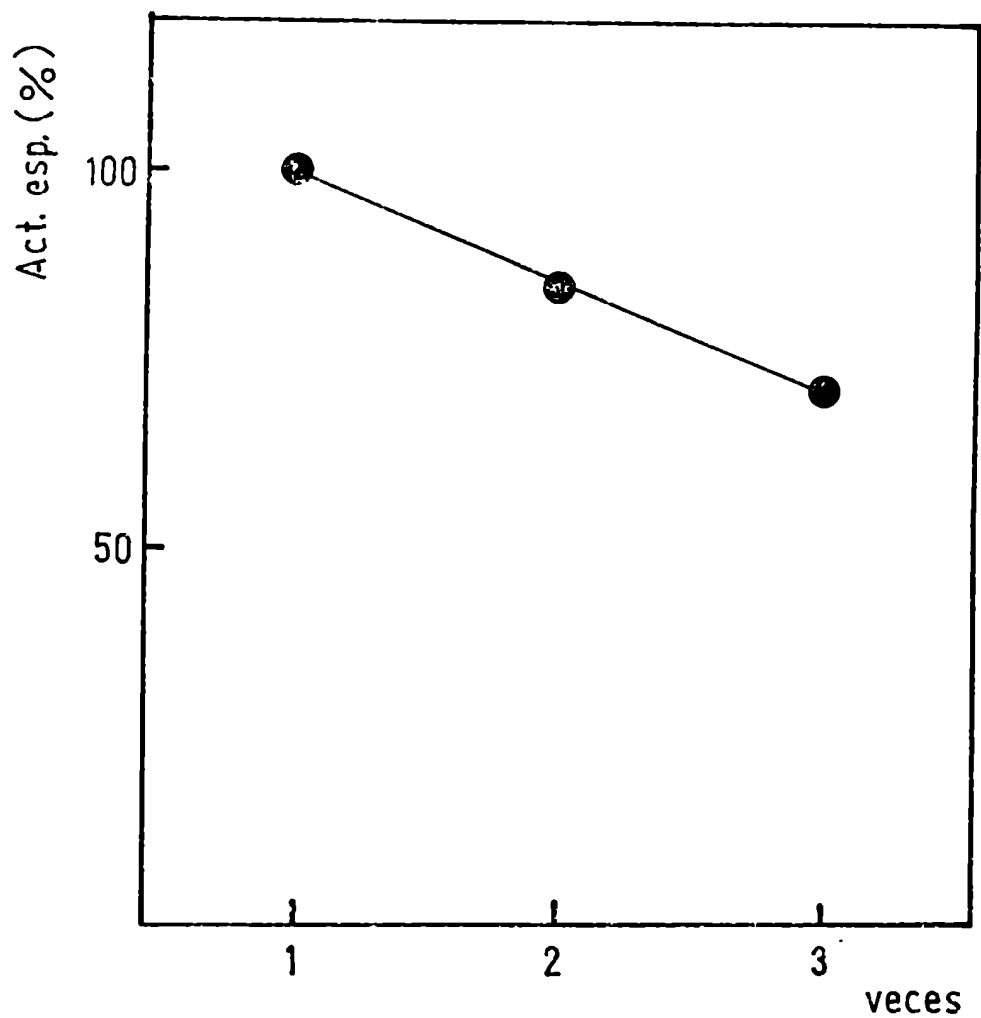


FIGURA II.10.: Modificaciones en la actividad específica de la rodenasa insolubilizada en función del uso repetido. La determinación de actividad enzimática se efectuó según Materiales y Métodos. Luego de cada incubación el gel se lavó 3 veces en batch con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 8,7 +  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  1 mM; el gel decantado se resuspendió al doble de su volumen en el mismo buffer para ser utilizado en la siguiente determinación.

## II.6. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES DE LA ENZIMA SOLUBLE E INMOVILIZADA

### II.6.1. Tiempo óptimo de incubación

Se investigó la variación de la actividad enzimática en función del tiempo de incubación para la enzima soluble (E) e inmovilizada (G-E-S).

En la Figura II.11. se representan los datos obtenidos; de ellos puede deducirse que para ambas enzimas no existe una relación lineal entre formación de producto y tiempo de incubación.

Como la actividad enzimática medida fue importante aún a tiempos cortos, se eligió 30 minutos como tiempo standard de incubación.

### II.6.2. Temperatura óptima de incubación

Se analizó la variación de actividad enzimática para la enzima soluble (E) e insolubilizada (G-E-S) en función de la temperatura de incubación.

De los datos graficados en la Figura II.12. puede comprobarse que la actividad para ambos sistemas enzimáticos aumenta linealmente con la temperatura hasta aproximadamente 37 °C, adoptándose ésta como temperatura standard de incubación.

### II.6.3. pH óptimo de incubación

Se estudió la variación de la actividad enzimática en función del pH utilizándose buffer Tris-ClH con un rango de pH variable entre 7,0 y 9,2.

Considerando que se forma una cupla entre el cianuro y el buffer Tris-ClH se midieron los pH's reales de incubación cuyos valores oscilaron entre 8,45 y 9,68.

De la Figura II.13. se deduce que tanto para la enzima soluble como para la insolubilizada la actividad enzimática aumenta con el pH de incubación, hallándose en ambos casos una zo-

na de pH óptimo entre 9,2 y 9,5.

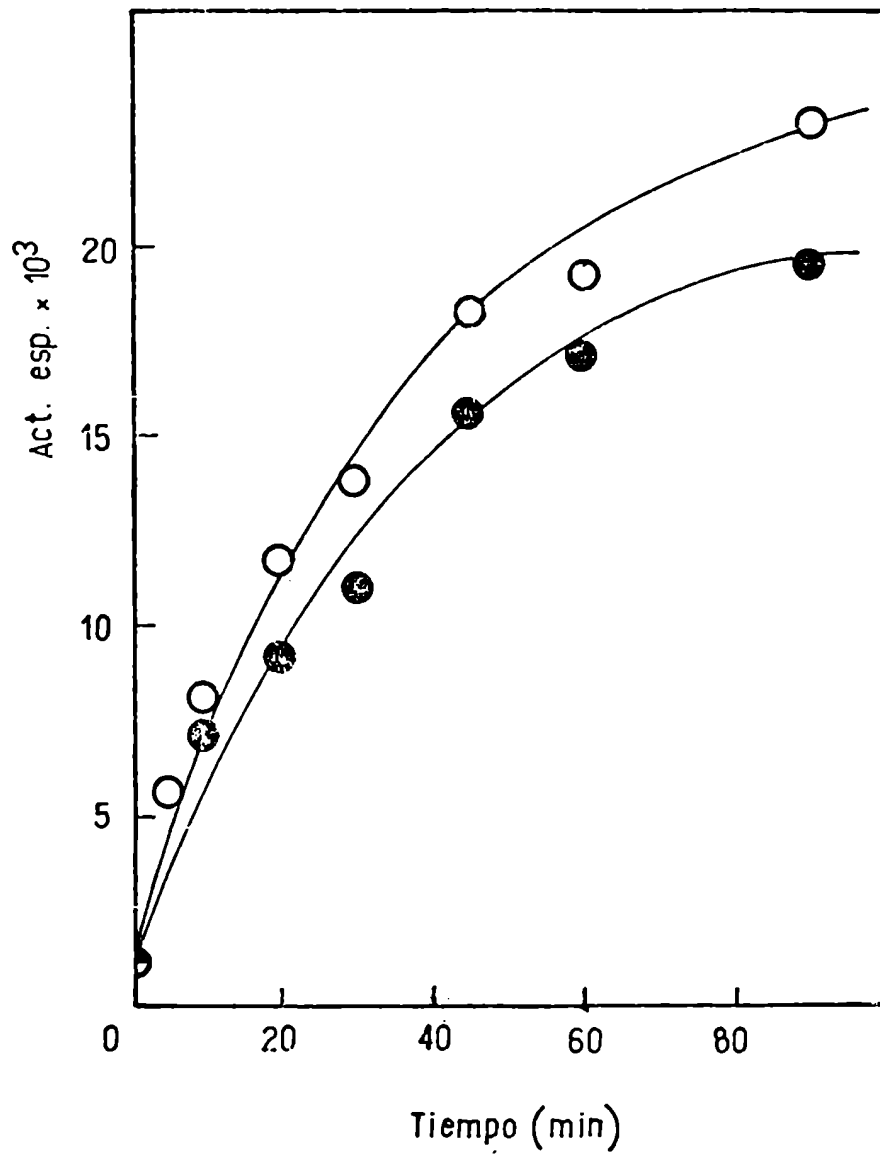


FIGURA II.11.: Estudio de la actividad enzimática en función del tiempo de incubación. Las medidas de actividad se hicieron de acuerdo a los procedimientos detallados en Materiales y Métodos.  
○ Enzima soluble; ● enzima inmovilizada.

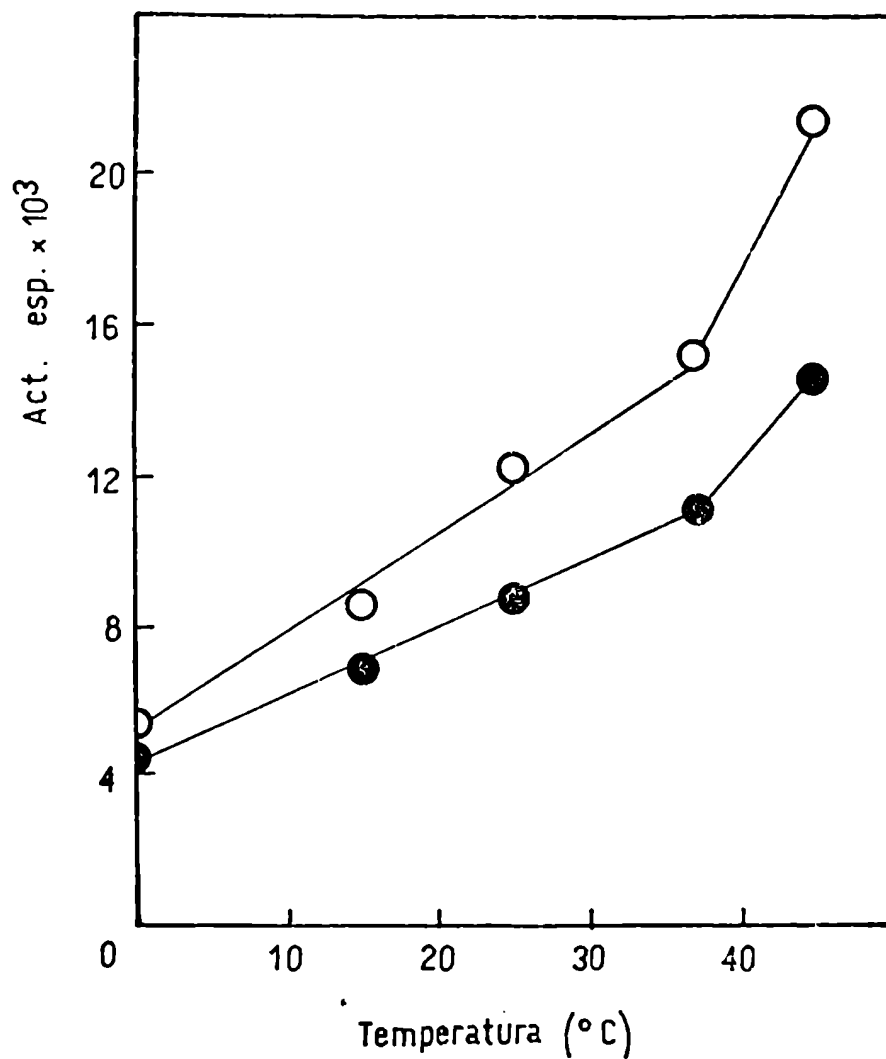


FIGURA II.12.: Curva de actividad enzimática en función de la temperatura de incubación. Las medidas de actividad se hicieron de acuerdo a los procedimientos detallados en Materiales y Métodos.  
 ○ Enzima soluble; ● enzima inmovilizada.

Teniendo en cuenta estos resultados se utilizó en la mezcla standard de incubación buffer Tris-ClH pH 8,7 que corresponde a un pH real de incubación de 9,2.

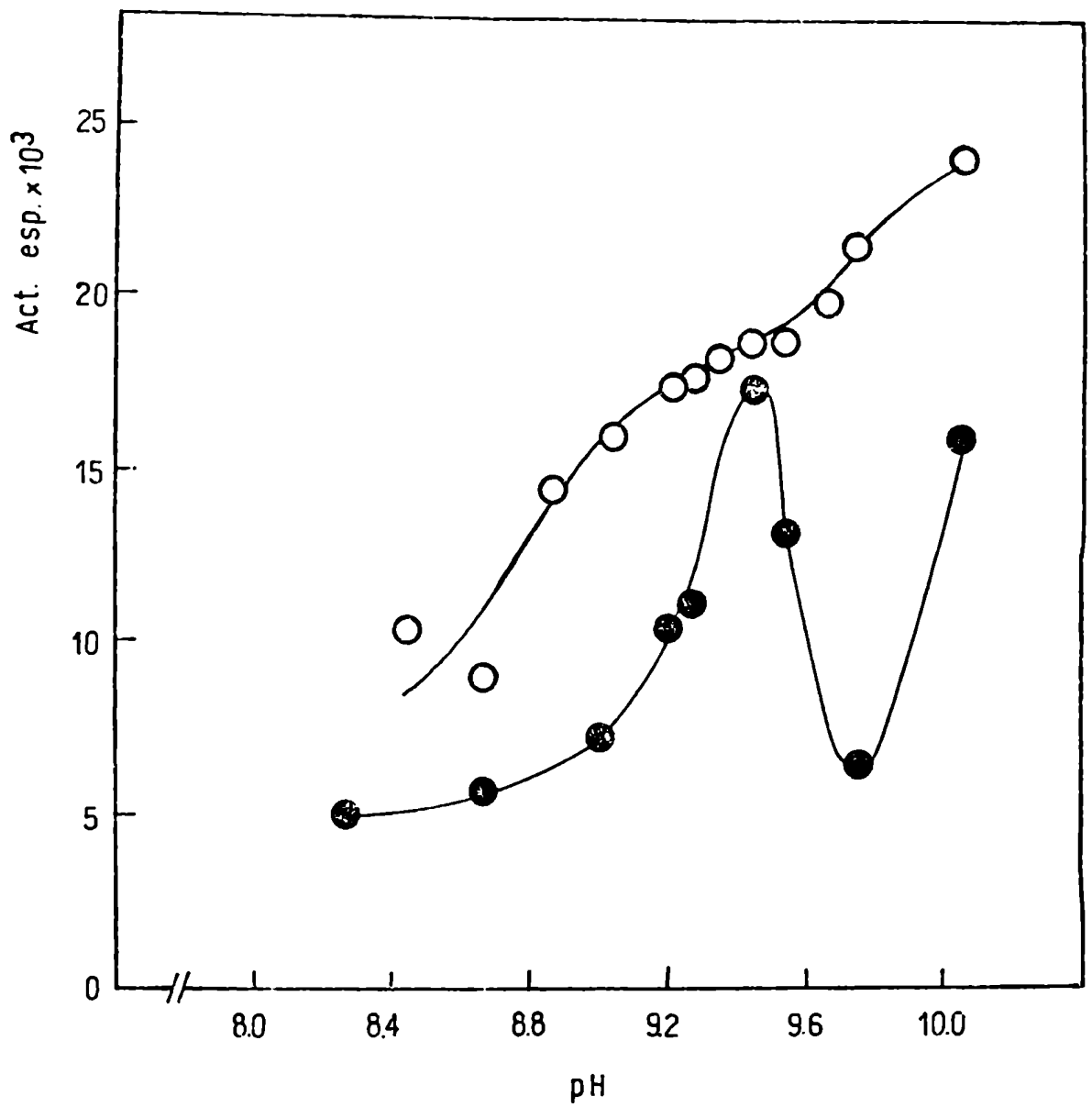


FIGURA II.13.: Actividad enzimática en función del pH de incubación.  
 Las medidas de actividad se hicieron de acuerdo a los procedimientos detallados en Materiales y Métodos.  
 ○ Enzima soluble; ● enzima inmovilizada.

#### II.6.4. Concentración óptima de proteína

Se investigó la variación de la actividad enzimática con cantidades crecientes de proteína tanto para la enzima soluble (E) como para la inmovilizada (G-E-S) (Figura II.14.).

En ambos casos se encontró una relación lineal entre el producto formado y las proteínas agregadas al sistema de incubación cuando el contenido de las mismas no superaba los 0,03 mg.

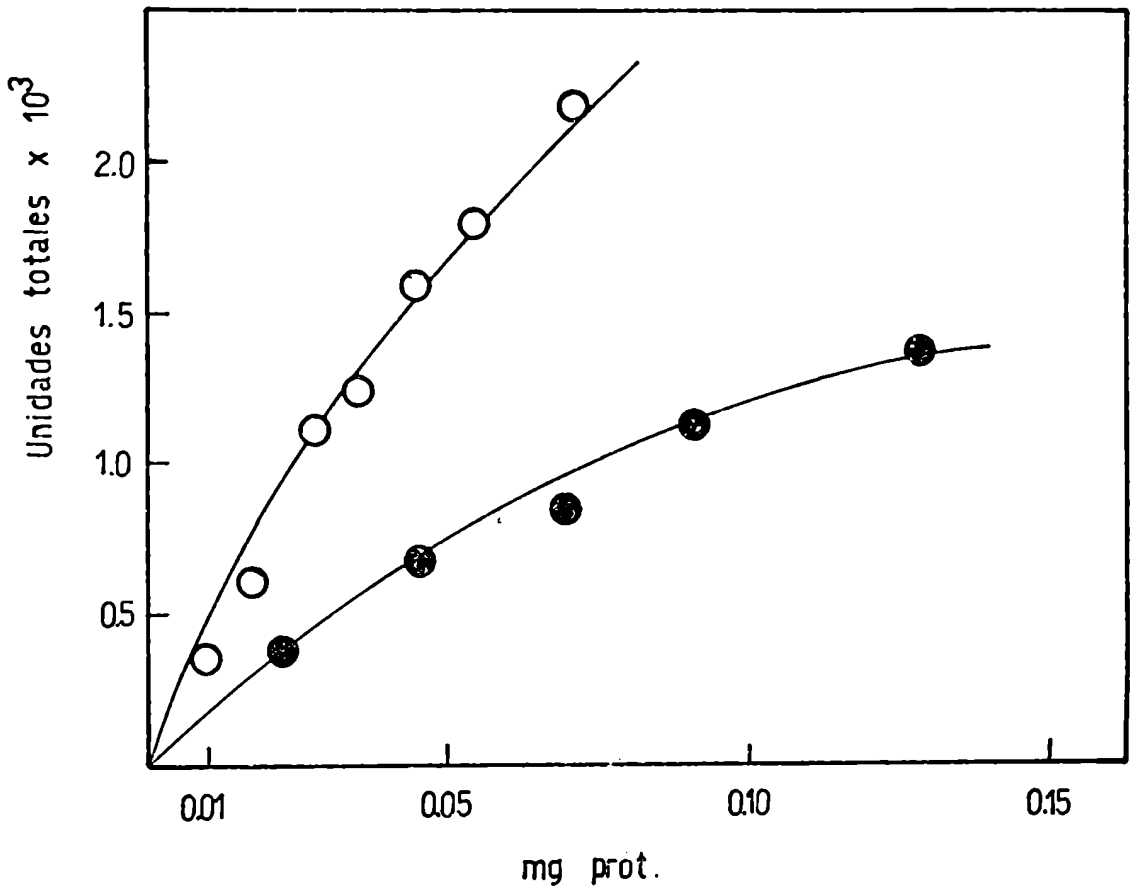


FIGURA II.14.: Relación entre la actividad enzimática y el contenido de proteína.  
 Los procedimientos empleados para medir la actividad enzimática son los detallados en Materiales y Métodos.  
 ○ Enzima soluble; ● enzima inmovilizada.



## II.7. ESTUDIOS CINETICOS

### II.7.1. Comportamiento cinético de la rodenasa soluble

#### II.7.1.1. Interacción con sus sustratos

Se estudió la variación de velocidad de formación del producto sulfocianuro en función de la concentración de uno de los sustratos a concentración constante del otro. Se emplearon tres concentraciones distintas del sustrato fijo: 10, 50 y 100 mM y para cada una de ellas, la concentración del sustrato variable se ensayó a 0,5; 1; 5; 10; 25; 50 y 100 mM. Como ya se había determinado (Sección II.6.1.) que la formación de producto no era lineal con el tiempo de incubación, cada uno de los sistemas se incubó durante 10, 20 y 30 minutos. Los valores de velocidad obtenidos se procesaron con una computadora VAX Modelo 11/750, para obtener las velocidades iniciales correspondientes. Con las inversas de los datos hallados se realizaron los gráficos de Lineweaver-Burk y las rectas fueron ajustadas por el método de cuadrados mínimos.

Las Figuras II.15. y II.16. muestran los gráficos de doble recíprocos obtenidos cuando el sustrato variable es tiosulfato y cianuro respectivamente. En ambos casos para concentraciones mayores de 50 mM del sustrato variable la velocidad disminuye marcadamente. Además se observa inhibición por el sustrato fijo, efecto que es mucho más marcado para el caso del tiosulfato. Ambas curvas son del tipo michaeliano como se comprueba por la linealidad de sus gráficos de doble recíprocos y corroborado, además, por sus respectivos gráficos de Hill ( $n = 1$ ) (Figuras II.17 a y II.18 a). Las rectas son intersectantes lo que indicaría un posible mecanismo ping-pong con una forma enzimática estable (E) y otra inestable (E-S). En este tejido la forma rodenasa azufre sustituida no pudo aislarse y cuando se intentó obtenerla resultó muy inestable.

En la Tabla II.6. se muestran los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  hallados a partir de las rectas obtenidas cuando la concentración del sustrato fijo es de 50 mM; puede observarse que el  $K_m$  es mucho mayor para el cianuro lo que indicaría menor afinidad por este sustrato y por lo tanto debería pensarse que la función detoxificante de cianuro no es el principal rol biológico que cum-

pliría esta enzima.

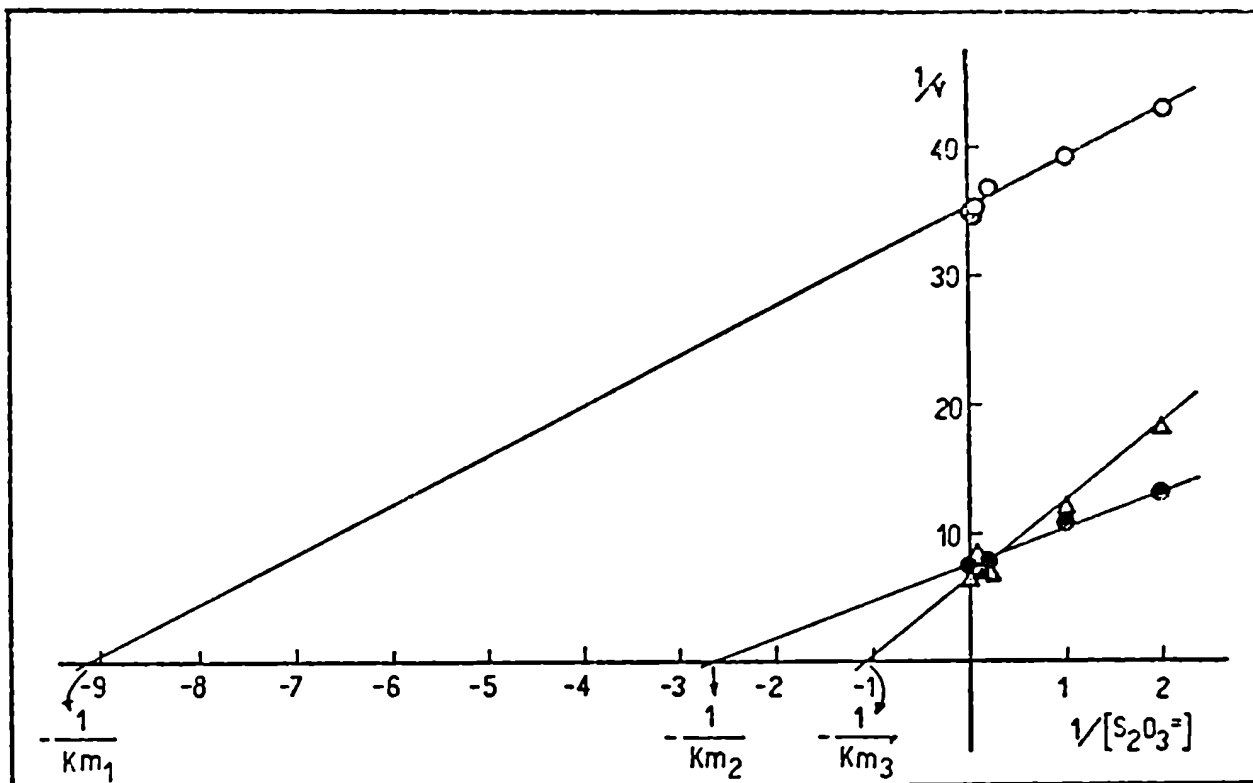


FIGURA II.15.: Gráfico de Lineweaver-Burk:  $1/v$  vs  $1/S_2O_3^{2-}$  para la rodenasa soluble purificada de *Rp. palustris* para concentraciones variables del sustrato tiosulfato. Las concentraciones de cianuro utilizadas fueron las siguientes: 10 mM ( $\circ$ ); 50 mM ( $\bullet$ ) y 100 mM ( $\Delta$ ). Las velocidades iniciales representadas se obtuvieron procesando los valores de formación de sulfocianuro hallados para cada concentración del sustrato variable en estudio por incubación a 10, 20 y 30 minutos. Las rectas se ajustaron por el método de cuadrados mínimos ( $r^2 = 0,90$ ).  $(1/v)$ :  $(\text{nmoles SCN}^- \times 10^3/30')^{-1}$ ;  $(1/S_2O_3^{2-})$ :  $(\text{mM})^{-1}$

#### II.7.1.2. Interacción con sus productos

Con el objeto de estudiar el efecto de los productos sobre la velocidad de reacción, se utilizaron tres concentraciones fijas de sulfito y sulfocianuro: 0,05; 0,1 y 0,3 mM y se

dió la formación del producto no agregado al sistema de incubación. Para evitar el efecto inhibitorio del sustrato variable se emplearon las siguientes concentraciones: 1; 2,5; 5; 7,5 y 10 mM mientras que el sustrato fijo se mantuvo en niveles saturantes.

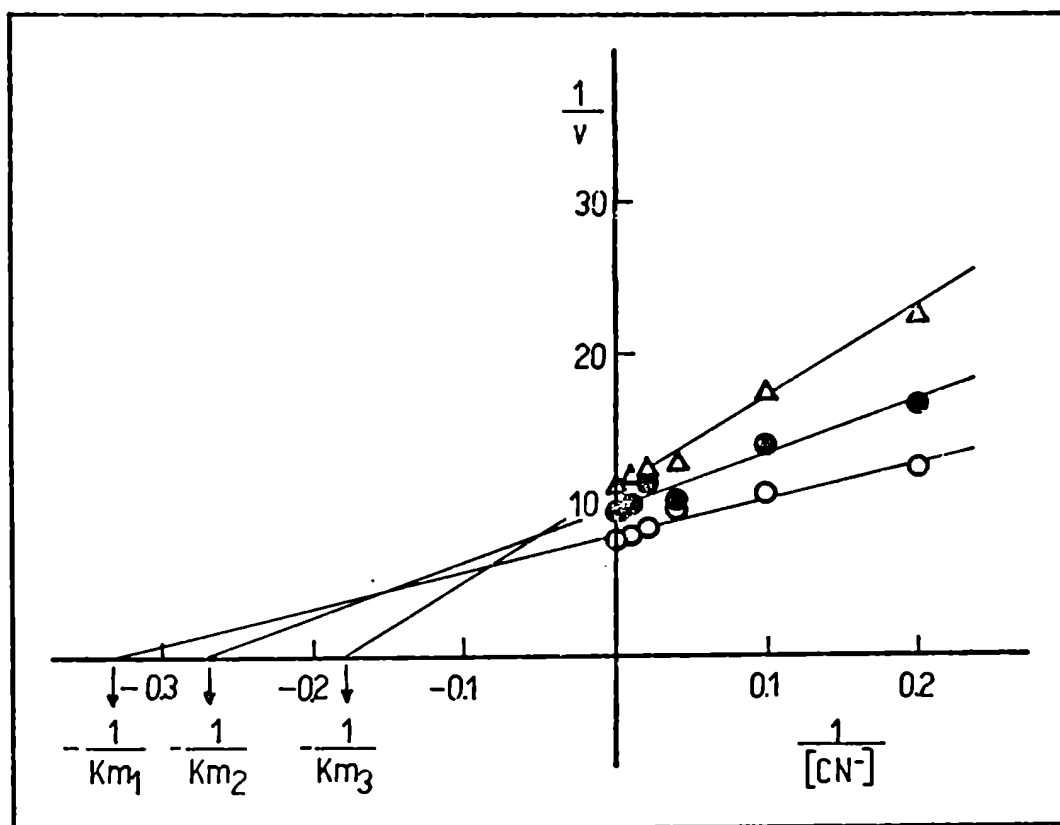


FIGURA II.16.: Gráfico de Lineweaver-Burk:  $1/v$  vs  $1/(\text{CN}^-)$  para la rodenasa soluble purificada de *Rp. palustris* para concentraciones variables del sustrato cianuro. Las concentraciones de tiosulfato utilizadas fueron las siguientes: 10 mM ( $\circ$ ); 50 mM ( $\bullet$ ) y 100 mM ( $\Delta$ ). Las velocidades iniciales representadas se obtuvieron procesando los valores de formación de sulfocianuro hallados para cada concentración en estudio del sustrato variable por incubación a 10, 20 y 30 minutos. Las rectas se ajustaron por el método de cuadrados mínimos ( $r^2 = 0,98-0,99$ ).  
 $(1/v)$ :  $(\text{nmoles SCN}^- \times 10^3 / 30')^{-1}$ ,  
 $(1/\text{CN}^-)$ :  $(\text{mM})^{-1}$

Las Figuras II.19. y II.20. muestran los gráficos de Hanes-Woolf (representación de  $s/v$  vs  $s$ ) cuando se estudió el efecto del sulfito utilizando como sustrato variable tiosulfato y cianuro respectivamente. En ambos casos el sulfito actuó como inhibidor; la inhibición obtenida resultó no-competitiva mixta

respecto del tiosulfato y no-competitiva pura respecto del cianuro.

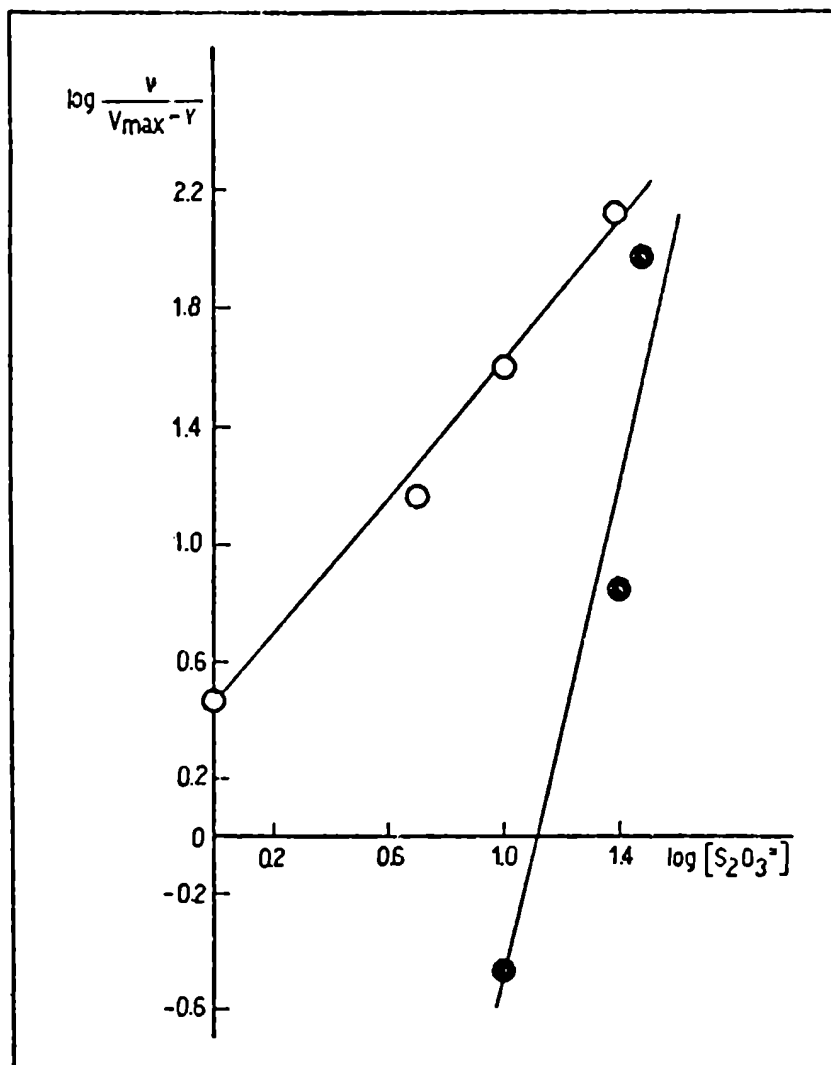


FIGURA II.17.: Gráfico de Hill:  $\log v/V_{\max}-v$  vs  $\log (S_2O_3^{2-})$ . Las determinaciones de velocidad se realizaron según se describe en el texto. Los valores representados corresponden a las velocidades iniciales y velocidad máxima obtenidos para concentraciones variables de  $S_2O_3^{2-}$ , manteniendo la concentración de  $CN^-$  en 50 mM. a) enzima soluble  $n=1$  ( $v$  y  $V_{\max}$  corresponden a los valores graficados en la Figura II.15. y b) enzima inmovilizada  $n=4$  ( $v$  y  $V_{\max}$  corresponden a los valores graficados en la Figura II.23 a).

a: (○); b: (●)

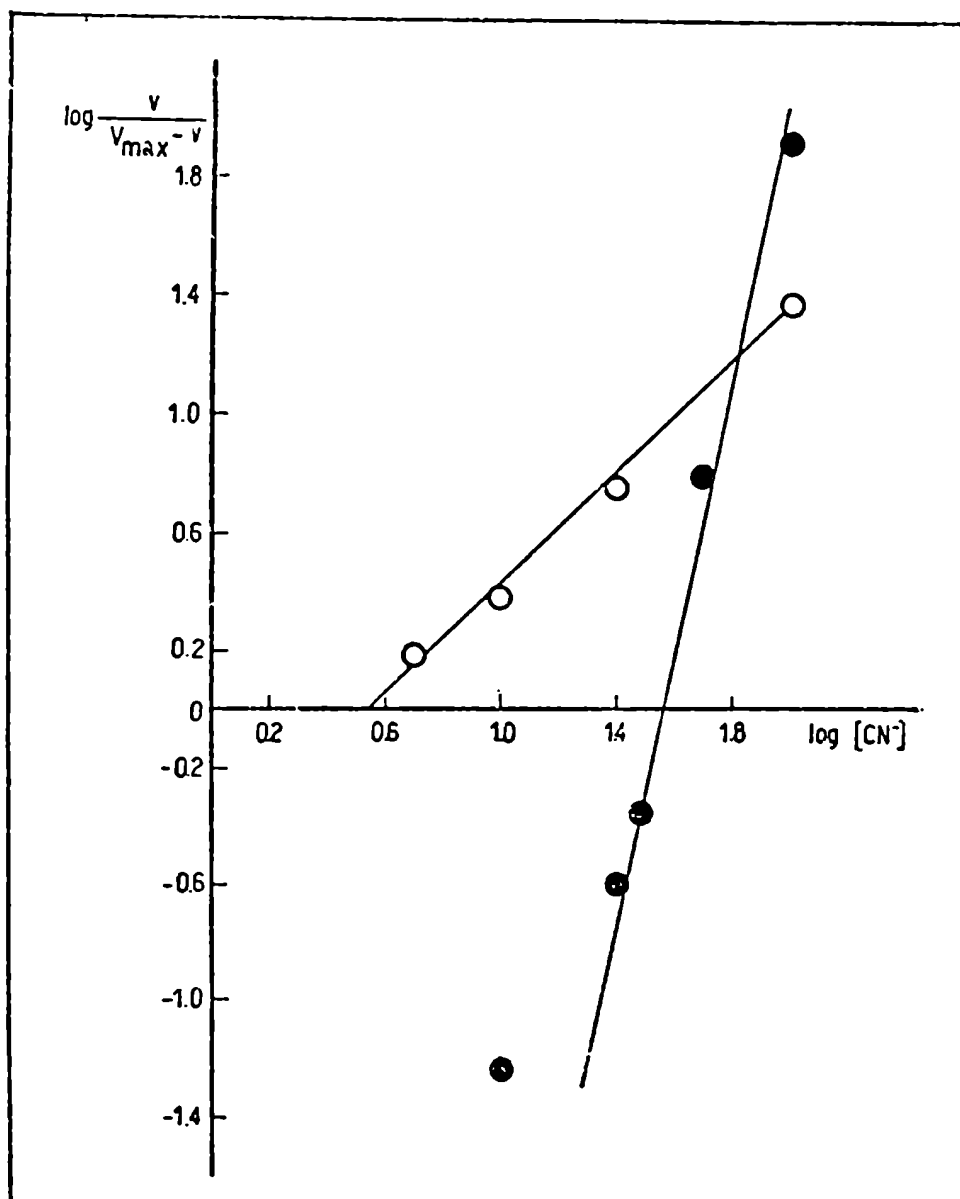


FIGURA II.13.: Gráfico de Hill:  $\log v/V_{max}-v$  vs  $\log (CN^-)$   
 Las determinaciones de velocidad se realizaron según se describe en el texto. Los valores representados corresponden a las velocidades iniciales y velocidad máxima obtenidos para concentraciones variables de  $CN^-$  y manteniendo constante la concentración de  $S_2O_3^{2-}$  en 50 mM. a) enzima soluble  $n=1$  ( $v$  y  $V_{max}$  corresponden a los valores graficados en la Figura II.16.); b) enzima inmovilizada  $n = 4,4$  ( $v$  y  $V_{max}$  corresponden a los valores graficados en la Figura II.23 b).  
 a: (○); b: (●)

TABLA II.6.: Parámetros cinéticos para la rodenasa purificada de *Rp. palustris*.

PARAMETRO CINETICO	SUSTRATO VARIABLE	
	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup>	CN <sup>-</sup>
V <sub>max</sub> (μmoles SCN <sup>-</sup> /30')	132,00	103,00
K <sub>m</sub> (mM)	0,38	3,70

Las condiciones experimentales utilizadas se describen en el texto y en Materiales y Métodos.

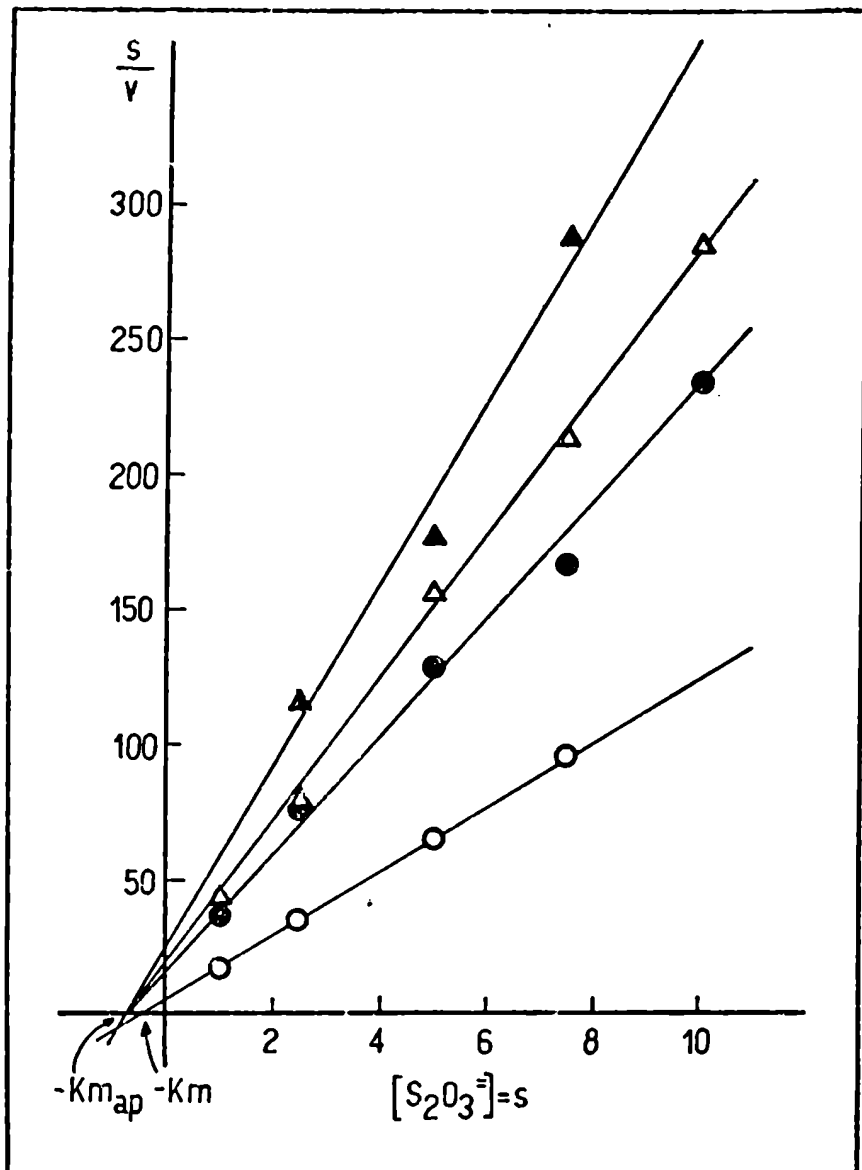
Las Figuras II.21. y II.22. muestran los gráficos de Hanes-Woolf correspondientes al estudio del efecto del sulfocianuro utilizando tiosulfato o cianuro como sustrato variable respectivamente. En los dos casos se produjo un aumento de la velocidad de reacción a concentraciones crecientes de sulfocianuro y no se detectó alteración del K<sub>m</sub>, indicando que el efecto no se debería a variaciones en las afinidades de la enzima por sus sustratos.

## II.7.2. Comportamiento cinético de la enzima insolubilizada

### II.7.2.1. Interacción con sus sustratos

Para investigar si la enzima inmovilizada se comportaba cinéticamente en forma análoga a la soluble, se midió la velocidad de formación de sulfocianuro para distintas concentraciones del sustrato variable (10, 25, 30, 50 y 100 mM) manteniendo constante la concentración del otro sustrato (50 mM) e incubando durante 10, 20 y 30 minutos. Los valores de velocidades iniciales se obtuvieron procesando los datos con una computadora

VAX 11/750. Las curvas de saturación obtenidas cuando se utilizó tiosulfato o cianuro como sustrato variable fueron sigmoideas (Figura II.23 a y b) y las dobles recíprocas no lineales, indicando que la enzima exhibía cooperatividad.



**FIGURA II.19.:** Efecto del producto sulfito sobre la velocidad de reacción utilizando como sustrato variable tiosulfato. Gráfico de Hanes-Woolf (representación de  $s/v$  vs  $s$ ) en función de la concentración de tiosulfato en ausencia ( $\circ$ ) y en presencia de 0,05 mM ( $\bullet$ ); 0,1 mM ( $\triangle$ ) y 0,3 mM ( $\blacktriangle$ ) de sulfito. La concentración de  $CN^-$  fija utilizada fue de 50 mM. Las velocidades se determinaron en función de la formación de sulfocianuro por incubación durante 10, 20 y 30 minutos. Las rectas se ajustaron por el método de cuadrados mínimos ( $r^2=0,90-0,98$ )  
 $(s/v): mM \times (nmoles SCN^- \times 10^3 / 30')^{-1}$   
 $(S_2O_3^{2-}): mM$   
 $K_m: 0,41 mM$  ;  $K_{m_{ap}}: 0,67 mM$

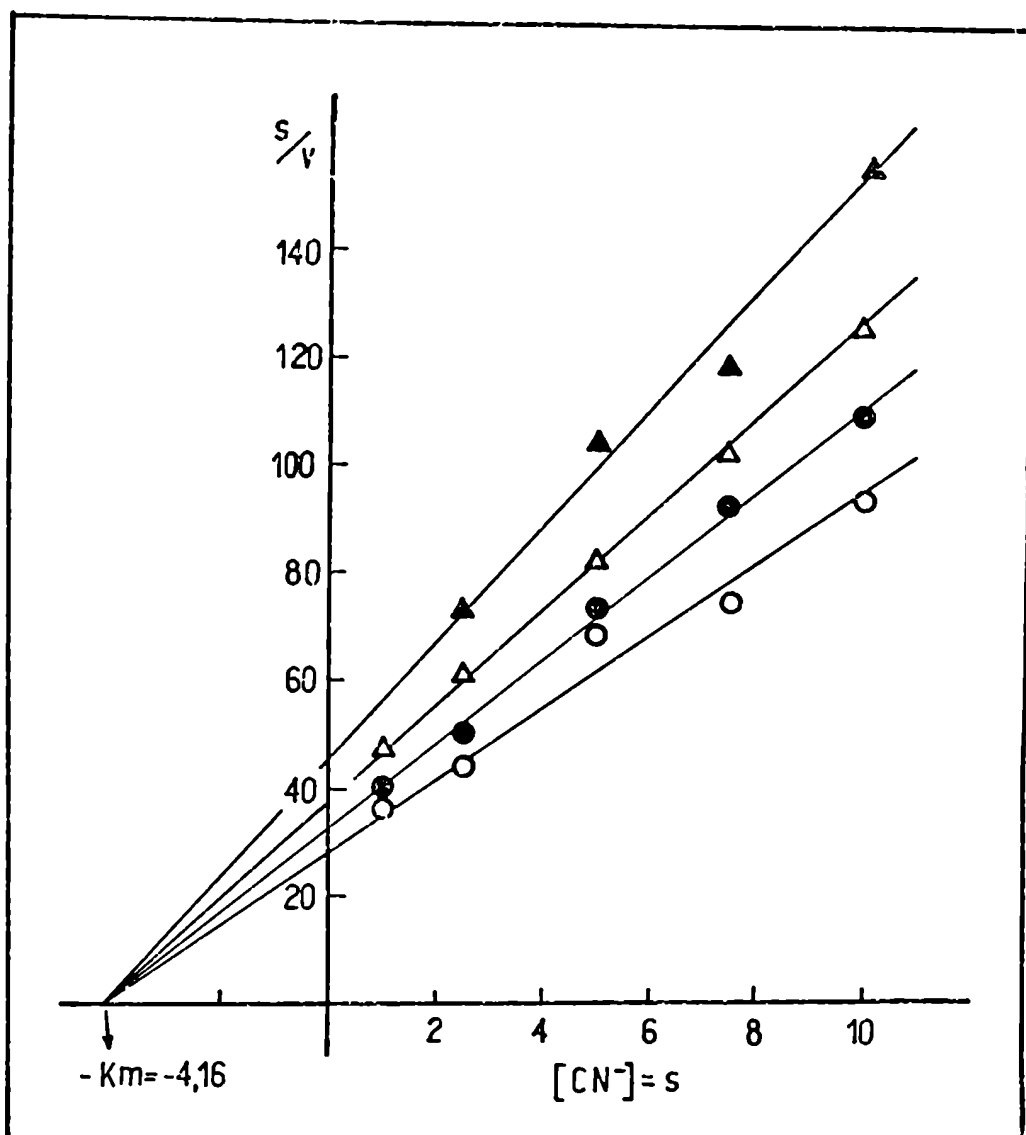


FIGURA II.20.: Efecto del producto sulfito sobre la velocidad de reacción utilizando como sustrato variable cianuro. Gráfico de Hanes-Woolf (representación de  $s/v$  vs  $s$ ) en función de la concentración de cianuro en ausencia ( $\circ$ ) y en presencia de 0,05 mM ( $\bullet$ ); 0,1 mM ( $\Delta$ ) y 0,3 mM ( $\blacktriangle$ ) de sulfito. La concentración de tiosulfato fija utilizada fue de 50 mM. Las velocidades se determinaron en función de la formación de sulfocianuro por incubación durante 10, 20 y 30 minutos. Las rectas se ajustaron por el método de cuadrados mínimos ( $r^2 = 0,98-0,99$ ).  
 $(s/v)$ : mM  $\times$  (nmoles  $SCN^- \times 10^3 / 30'$ ) $^{-1}$   
 $(CN^-)$ : mM



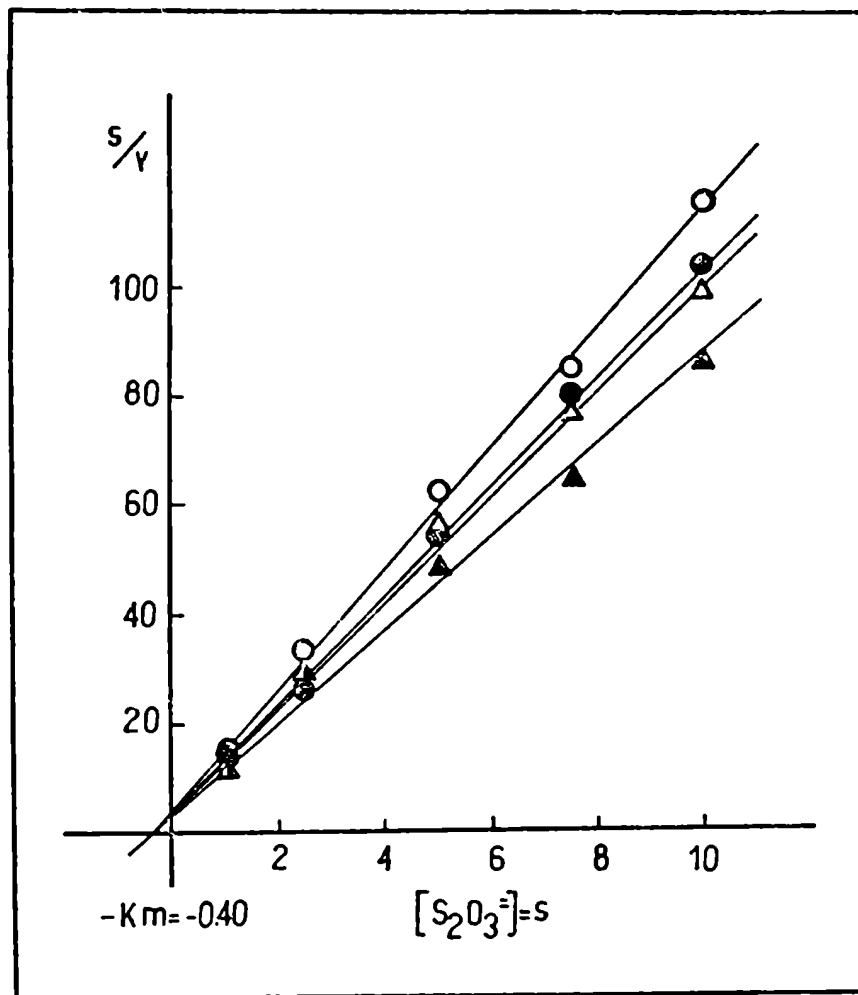


FIGURA II.21.: Efecto del producto sulfo-  
cianuro sobre la velocidad  
de reacción utilizando como  
sustrato variable tiosulfa-  
to.  
Gráfico de Hanes-Woolf (re-  
presentación de  $s/v$  vs  $s$ )  
en función de la concentra-  
ción de tiosulfato en ausen-  
cia ( $\circ$ ) y en presencia de  
0,05 mM ( $\bullet$ ); 0,1 mM ( $\Delta$ ) y  
0,3 mM ( $\blacktriangle$ ) de sulfocianuro.  
La concentración de cianuro  
fija utilizada fue de 50 mM.  
Las velocidades se determi-  
naron en función de la forma-  
ción de sulfito por incu-  
bación durante 10, 20 y 30  
minutos. Las rectas se ajust-  
taron por el método de cua-  
drados mínimos ( $r^2=0,90-$   
1,00)  
( $s/v$ ): mM x  $\mu\text{moles SO}_3^= \times 10^3 / 30'$ )<sup>-1</sup>  
( $S_2O_3^=$ ): mM

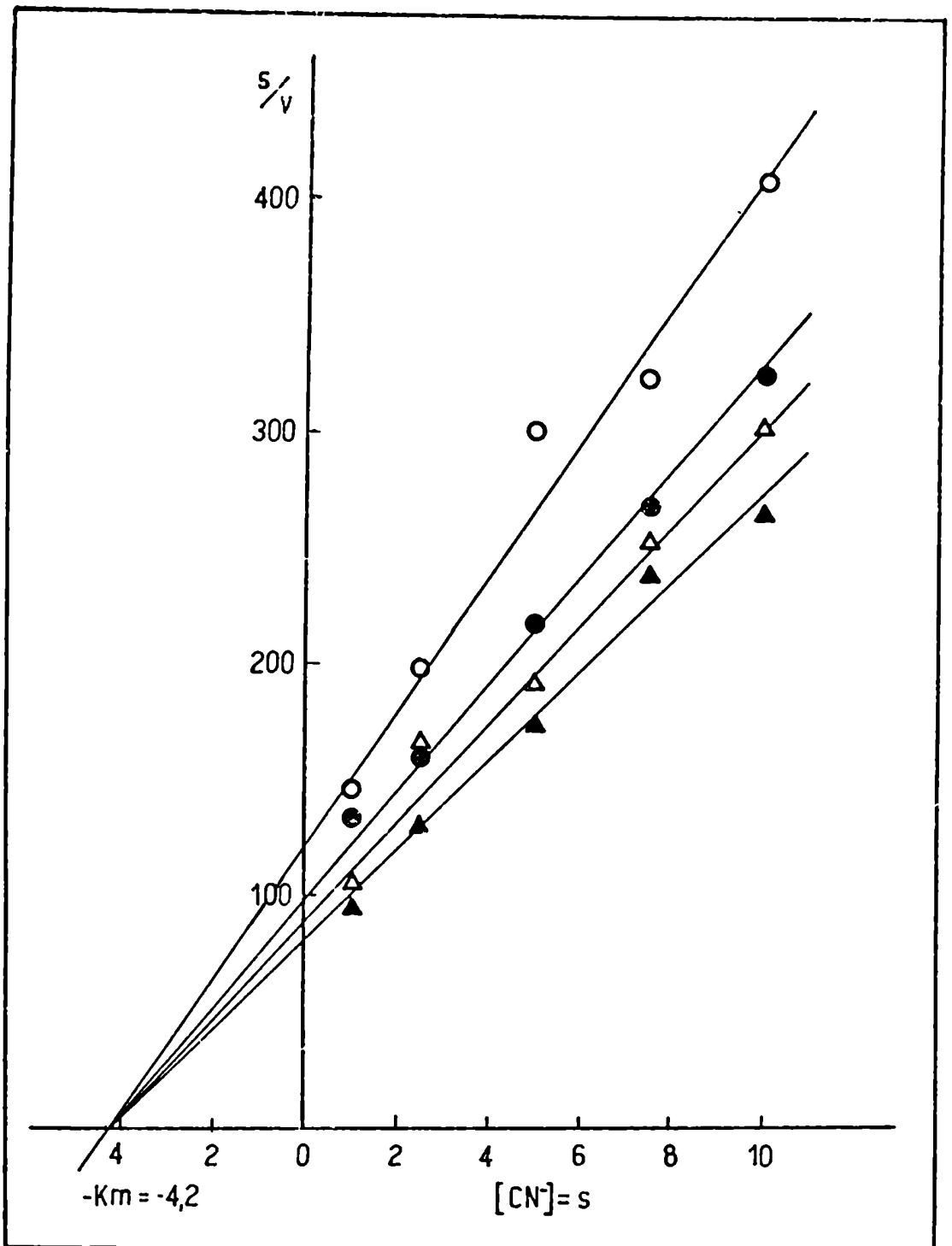


FIGURA II.22.: Efecto del producto sulfocianuro sobre la velocidad de reacción utilizando como sustrato variable cianuro. Gráfico de Hanes-Woolf (representación  $s/v$  vs  $s$ ) en función de la concentración de cianuro en ausencia ( $\circ$ ) y en presencia de 0,05 mM ( $\bullet$ ); 0,1 mM ( $\Delta$ ) y 0,3 mM ( $\blacktriangle$ ) de sulfocianuro. La concentración de tiosulfato fija utilizada fue de 50 mM. Las velocidades se determinaron en función de la formación de sulfito por incubación durante 10, 20 y 30 minutos. Las rectas se ajustaron por el método de cuadrados mínimos ( $r^2=0,96-1,00$ ).  
 $(s/v)$ : mM  $\times$  (nmoles  $SO_3^- \times 10^3/30'$ )<sup>-1</sup>  
 $(CN^-)$ : mM

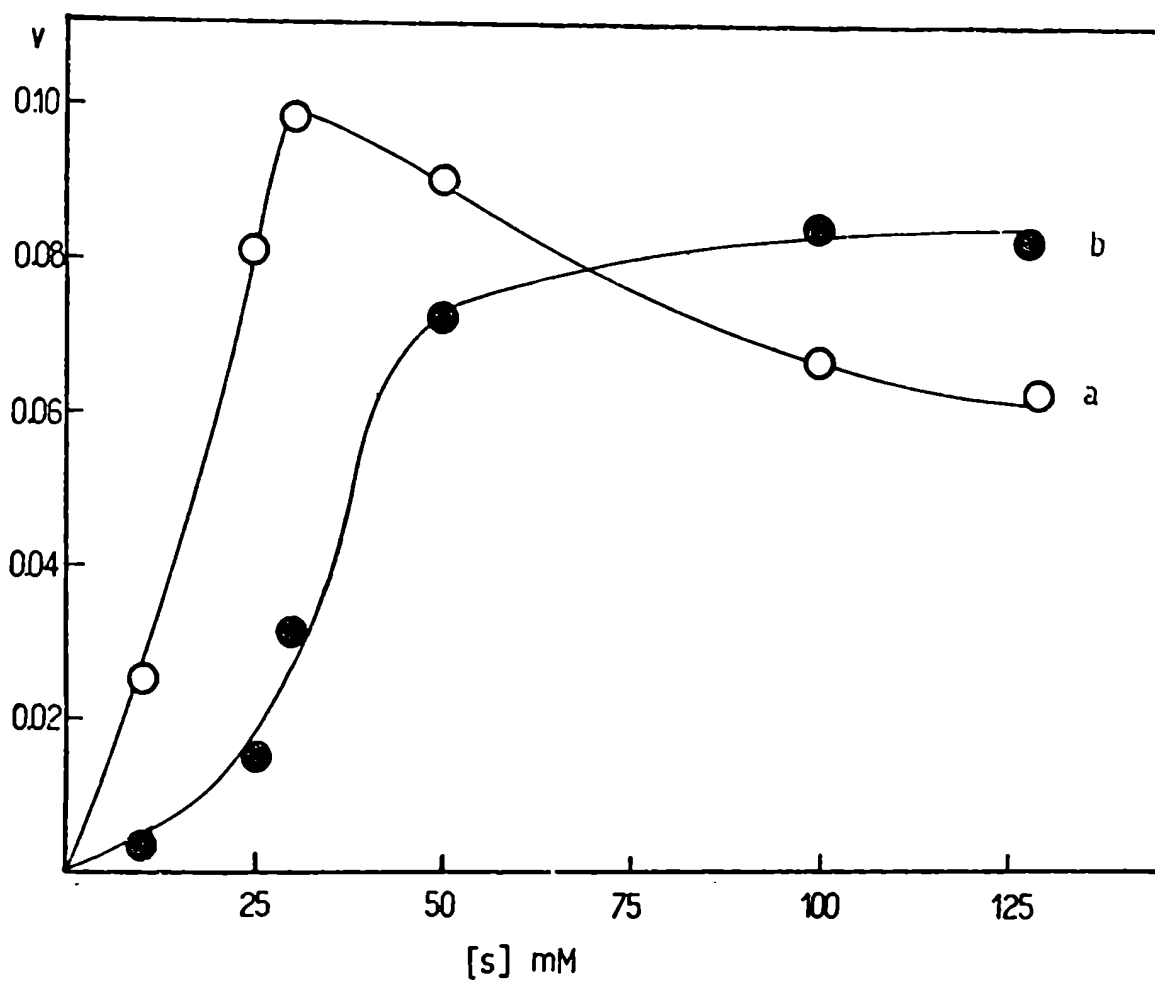


FIGURA II.23.: Curvas de saturación por sustrato para la rodenasa inmovilizada de *Rp. valustris*. Las velocidades iniciales representadas se obtuvieron procesando los valores de formación de sulfocianuro hallados para cada concentración en estudio del sustrato variable por incubación a 10, 20 y minutos. (○) sustrato variable tiosulfato, concentración de cianuro constante e igual a 50 mM. (●) sustrato variable cianuro, concentración de tiosulfato constante e igual a 50 mM  
 (v): nmoles  $\text{SCN}^- \times 10^3 / 30'$ ; (s): mM

De los gráficos de Hill correspondientes (Figuras II.17 b y II.18 b) se comprobó que en ambos casos la cooperatividad era de tipo positiva ( $n > 1$ ), demostrándose así, que la enzima inmovilizada presenta un comportamiento cinético totalmente diferente al de la enzima soluble.

## II.8. MECANISMO QUIMICO DE LA RODENASA

De los estudios cinéticos efectuados sobre la enzima purificada de *Rp. palustris* se postuló un esquema que respondía a un comportamiento de doble desplazamiento con una forma enzimática inestable; además se observó inhibición por ambos sustratos, muy pronunciada para el caso del tiosulfato, e inhibición por el producto sulfito y un efecto opuesto provocado por el otro producto sulfocianuro; teniendo en cuenta estos resultados se decidió encarar el estudio del mecanismo químico de la rodenasa tratando de aislar la forma azufre sustituida.

Considerando las ventajas que ofrece el empleo de enzimas inmovilizadas para determinar el mecanismo químico de una reacción enzimática se decidió utilizar esta técnica con el objeto de identificar las distintas etapas que conducen a la formación de producto en la reacción catalizada por rodenasa.

Se realizaron, entonces, una serie de experiencias empleando en todos los casos la enzima inmovilizada sobre gel de Sepharosa 4B en presencia de tiosulfato (G-E-S).

### II.8.1. Interacción de la rodenasa inmovilizada con sus sustratos

Para determinar el orden de unión de los sustratos se hizo reaccionar en todos los casos 2 ml de G-E-S (0,46 mg de proteína/ml de gel resuspendido,  $E_1$ ), con cada sustrato, a la concentración óptima determinada previamente (2 mmoles), durante 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C). El complejo obtenido se empaquetó en columnas de 0,9 cm de diámetro por 1,5 cm de alto y se lavó en todos los casos con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 8,7 para eliminar los sustratos o productos no unidos al gel.

El volumen eluido después de cada etapa se recogió de la siguiente forma:

- elución del sembrado;

luego se agregó buffer de lavado reuniéndose:

- 6 tubos de 0,2 ml,

- 10 tubos de 1 ml cada uno.

A cada fracción recogida se le midió sulfocianuro formado. Luego del lavado, se tomó una alícuota de la enzima inmovilizada y se le determinó actividad de rodenasa en presencia de ambos sustratos ( $S_2O_3^{=}$  +  $CN^-$ ), de uno solo de ellos, o en ausencia de ambos (buffer).

Simultáneamente se realizaron las mismas experiencias controles utilizando Sepharosa 4B en lugar de rodenasa inmovilizada.

En la Figura II.24. se muestran las secuencias de sustratos utilizados.

- Secuencia 1:  $S_2O_3^{=}$ ,  $CN^-$

En la Tabla II.7. se detallan los resultados obtenidos cuando el complejo G-E-S ( $E_I$ ) es tratado primero con tiosulfato y luego con cianuro, ambos en concentraciones saturantes. De estos datos se puede deducir que el tiosulfato es capaz de unirse a la enzima inmovilizada formando un complejo ( $E_{II}$ ) que por incubación con cianuro produce sulfocianuro. Como era de esperar, no se libera producto de la columna ya que hasta este momento la enzima no estuvo en contacto con cianuro (Figura II.25. ; Eluído II).

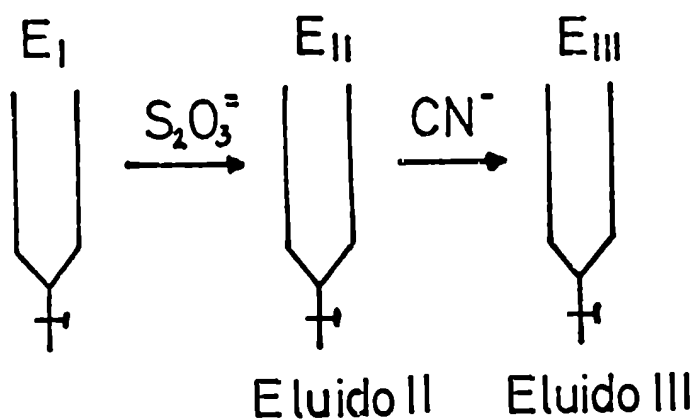
Por pasaje del otro sustrato (cianuro) a través de la columna conteniendo el complejo  $E_{II}$  se obtiene un nuevo complejo enzimático ( $E_{III}$ ) con elución de cantidades significativas de sulfocianuro (Figura II.25.; Eluído III). Este complejo  $E_{III}$  no forma producto cuando se lo incuba en presencia de tiosulfato.

De los datos obtenidos en esta experiencia (Secuencia 1) se concluye que la enzima inmovilizada forma un complejo con tiosulfato capaz de producir sulfocianuro por tratamiento con cianuro. Además cuando el cianuro es agregado a la enzima saturada con tiosulfato no queda retenido sobre la superficie de la misma.

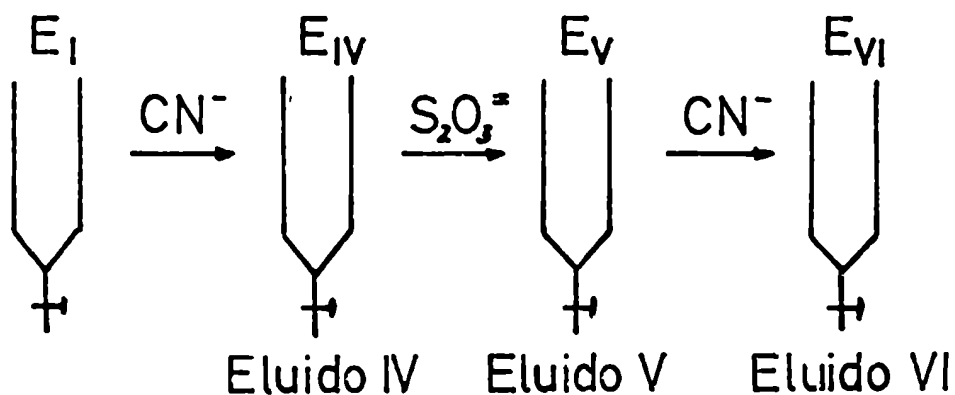
- Secuencia 2:  $CN^-$ ,  $S_2O_3^{=}$ ,  $CN^-$

Para comprobar si el cianuro era capaz de unirse como primer sustrato formando un complejo  $E_{IV}$  con la enzima, se trató  $E_I$  con cianuro (2 mmoles). Posteriormente se hizo reaccionar  $E_{IV}$  con cantidades saturantes de tiosulfato ( $E_V$ ) y por último se añadió cianuro nuevamente ( $E_{VI}$ ).

Secuencia 1:



Secuencia 2:



Secuencia 3:

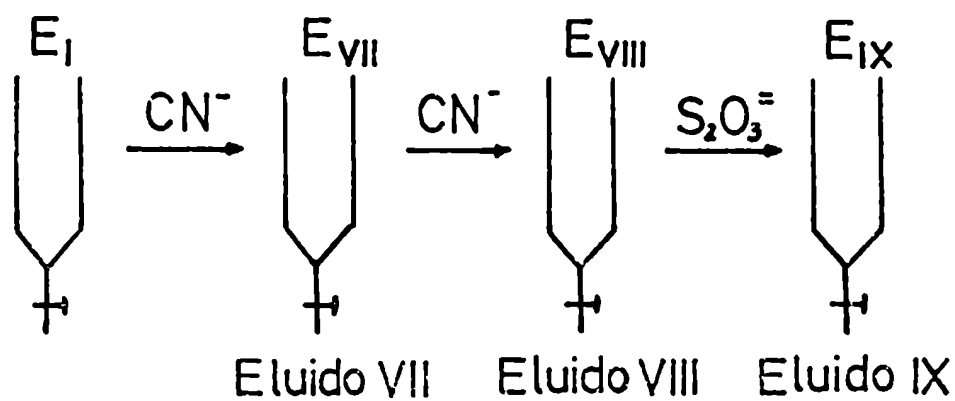


FIGURA II.24.: Diagrama del orden de agregado de sustratos. Se esquematiza la secuencia seguida en cada experiencia.  $E_I = G-E-S$ ;  $E_i$  ( $i=II$  a  $IX$ ) = Complejo enzimático formado después del pasaje del sustrato señalado.

TABLA II.7.: Actividad de rodenasa inmovilizada luego de la interacción con sus sustratos

ENZIMA	UNIDADES/ml x 10 <sup>3</sup>				ACTIVIDAD REMANENTE RESPECTO E <sub>I</sub>
	+ S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> + CN <sup>-</sup> + buffer	+ S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> - CN <sup>-</sup> + buffer	- S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> + CN <sup>-</sup> + buffer	- S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> - CN <sup>-</sup> + buffer	%
	E <sub>I</sub>	5,53		0,54	0
E <sub>II</sub>	2,36		0,53	0	43
E <sub>III</sub>	1,30	0,00		0	24
E <sub>IV</sub>	1,87	0,55		0	34
E <sub>VI</sub>	1,55	0,00		0	28
E <sub>IX</sub>	5,39	0,00	6,60	0	98

La determinación de actividad se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. E<sub>I-IX</sub>: son alícuotas de la enzima inmovilizada luego de ser sometida a las reacciones detalladas en las secuencias 1-3.

Los resultados de esta experiencia se encuentran detallados en la Tabla II.7. y Figura II.25. El pasaje de cianuro sobre E<sub>I</sub> liberó el producto sulfocianuro debido a que la enzima había sido inmovilizada en presencia de tiosulfato 1 mM (Eluido IV). Además parte del cianuro agregado quedó retenido en la enzima ya que por incubación del complejo E<sub>IV</sub> en presencia de tiosulfato se obtuvo producto. Sin embargo el tratamiento de E<sub>IV</sub> con tiosulfato no produjo cantidades significativas de sulfocianuro indicando que el cianuro retenido no es liberado por acción del tiosulfato.



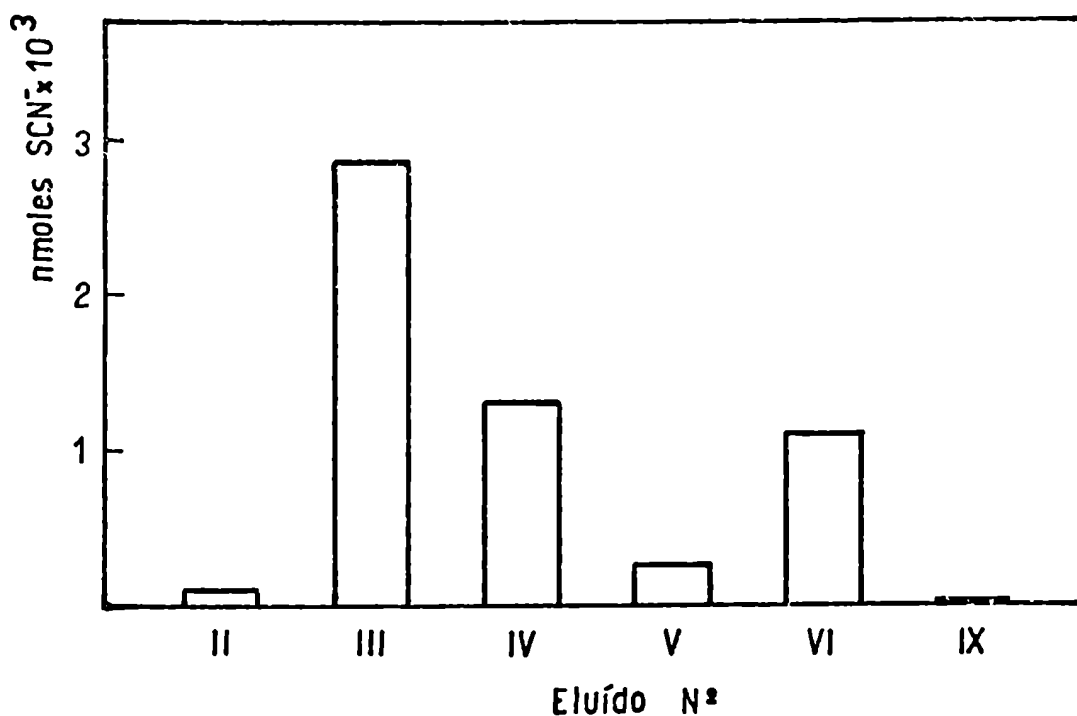


FIGURA II.25.: Gráfico de elución de sulfocianuro formado en las secuencias 1-3. La determinación de sulfocianuro se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Eluido II-IX son los volúmenes recogidos de las columnas detalladas en las secuencias 1-3.

El complejo  $E_V$  tratado con cianuro ( $E_{VI}$ ) liberó cantidades importantes de producto (Eluido VI); pero la incubación de  $E_{VI}$  con tiosulfato no formó sulfocianuro, sugiriendo que el azufre del complejo  $E_V$  había sido captado por el cianuro formando y eluyéndose el compuesto correspondiente, sin quedar retenido sobre la superficie de la enzima.

- Secuencia 3:  $CN^-$ ,  $CN^-$ ,  $S_2O_3^{2-}$

Para corroborar el mecanismo postulado según el cual el cianuro quedaría retenido sobre la enzima sin capacidad de dar producto por incubación en presencia de tiosulfato, se decidió hacer reaccionar  $E_I$  con cianuro 50 mM, lavar el complejo obteni

actividad de rodenasa en cada etapa en presencia y ausencia de los sustratos. En los eluidos recogidos se investigó la presencia de los productos de reacción.

En todos los casos se efectuaron los controles respectivos empleando gel de Sepharbsa 4 B sin tratar.

- Secuencia 4:  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^-$  +  $\text{CN}^-$

En la Figura II.26. se detalla la secuencia de reactivos agregados para estudiar el efecto del sulfito.

Secuencia 4:

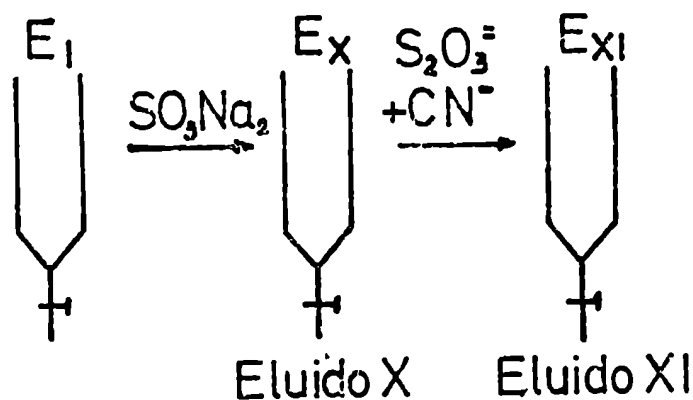


FIGURA II.26.: Efecto del sulfito.

Se esquematiza la secuencia empleada para estudiar el efecto del sulfito.  $E_1 = \text{G-E-S}$ .  $E_i$  ( $i = X$  y  $XI$ ) = Complejo enzimático formado después del pasaje del reactivo indicado.

En la Tabla II.8. se describen los valores obtenidos cuando el complejo G-E-S (1 ml gel resuspendido) se trató primero con sulfito (12  $\mu\text{moles}$ ) y luego con la mezcla de sustratos (2 mmoles de cada uno de ellos).

La interacción del sulfito con la enzima inmovilizada causó una inhibición de la actividad de rodenasa medida en presencia de ambos sustratos como así también una disminución en la ca

pacidad de reacción del complejo G-E-S determinada por incubación con cianuro ( $E_I = 540$  unidades/ml;  $E_X = 200$  unidades/ml). El posterior pasaje de los dos sustratos revirtió la inhibición producida por sulfito e incluso aumentó la actividad de la proteína insolubilizada. En el eluido XI se detectó formación de producto por acción de la rodenasa luego del agregado de los sustratos.

TABLA II.8.: Actividad de rodenasa inmovilizada luego de la interacción con sulfito y ambos sustratos

ENZIMA	UNIDADES/ml x 10 <sup>3</sup>			ACTIVIDAD REMANENTE
	+ S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup>	- S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup>	- S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup>	RESPECTO E <sub>I</sub>
	+ CN <sup>-</sup>	+ CN <sup>-</sup>	- CN <sup>-</sup>	%
	+ buffer	+ buffer	+ buffer	
E <sub>I</sub>	5,53	0,54	0	100
E <sub>X</sub>	1,28	0,20	0	23
E <sub>XI</sub>	2,44		0	44

La determinación de actividad se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. E<sub>I</sub>, X y XI = son alícuotas de la enzima inmovilizada luego de ser sometida al tratamiento descrito en el texto. En todos los casos se efectuaron las correcciones pertinentes debido a la formación no enzimática de producto (controles).

- Secuencia 5: SCN<sup>-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>=</sup> + CN<sup>-</sup>

En la Figura II.27. se detalla la secuencia de reactivos empleada para estudiar el efecto del sulfocianuro.

El agregado de sulfocianuro sobre el complejo G-E-S modificó la actividad del mismo cuando se la midió en presencia de

ambos sustratos (Tabla II.9.). Teniendo en cuenta, además, que el tratamiento de  $E_I$  con diversos compuestos produjo en todos los casos descritos una disminución de la actividad enzimática mayor que la observada en este paso, podemos concluir que el pasaje de sulfocianuro causó un aumento en la actividad remanente de la enzima inmovilizada ( $E_{XII} = 2.930$  unidades/ml), sin modificar sensiblemente la capacidad reactiva del complejo gel-enzima-azufre determinado por incubación en presencia de cianuro.

Secuencia 5:

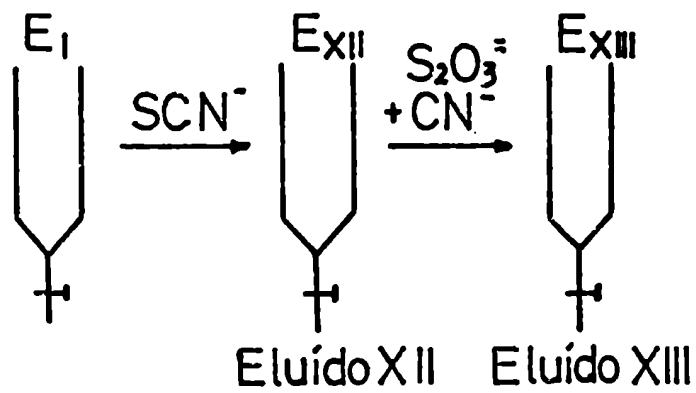


FIGURA II.27.: Efecto del sulfocianuro. Se esquematiza la secuencia empleada para estudiar el efecto del sulfocianuro;  $E_I = G-E-S$ ;  $E_i$  ( $i = XII$  y  $XIII$ ) = complejo enzimático formado después del pasaje del reactivo indicado.

TABLA II.9.: Actividad de rodenasa inmovilizada luego de la interacción con sulfocianuro y ambos sustratos

ENZIMA	UNIDADES/ml x 10 <sup>3</sup>			ACTIVIDAD REMANENTE
	+ S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup>	- S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup>	- S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup>	RESPECTO DE E <sub>I</sub>
	+ CN <sup>-</sup>	+ CN <sup>-</sup>	- CN <sup>-</sup>	
	+ buffer	+ buffer	+ buffer	%
E <sub>I</sub>	5,53	0,54	0	100
E <sub>XII</sub>	2,93	0,44	0	53
E <sub>XIII</sub>	1,70		0	31

La determinación de actividad se realizó de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. E<sub>I</sub>, XII y XIII = son alícuotas de la enzima inmovilizada luego de ser sometida al tratamiento descrito en el texto. En todos los casos se efectuaron las correcciones pertinentes, debido a la formación no enzimática de producto.

Sin embargo, el posterior tratamiento con los sustratos produjo una disminución de la actividad enzimática, sugiriendo que la interacción de sulfocianuro con la rodenasa inmovilizada modificó el sitio activo resultando finalmente una especie enzimática menos activa. Posiblemente el sulfocianuro deforma el sitio de unión de los sustratos alterando la entrada correcta de los mismos en condiciones saturantes.

## II.9. INTERACCION DE LA RODENASA CON DISTINTAS ENZIMAS

Hasta ahora no está definido el principal rol biológico de la rodenasa. Una de las funciones más importantes que actualmente se le atribuyen, es su capacidad de actuar como sulfotransferasa frente a distintas proteínas aceptoras. En base a estas consideraciones se decidió estudiar la actividad de sulfotransferasa de la rodenasa proveniente de *Rp. palustris*; para ello se llevaron a cabo una serie de experiencias con las siguientes enzimas sulfhidrúlicas: ALA-S, ALA-D y malato-deshidrogenasa (M-DH).

Dichas experiencias se realizaron utilizando columnas de 2 cm de diámetro por 2 cm de alto, conteniendo rodenasa inmovilizada en presencia de tiosulfato (5 ml G-E-S resuspendidos al doble de volumen; 0,46 mg de proteína/ml de gel resuspendido) ( $E_1$ ). En todos los casos la enzima se hizo reaccionar primeramente con tiosulfato a la concentración óptima durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavó con 10 volúmenes de buffer Tris-ClH 0,05 M pH 8,7. A continuación se sembró la enzima en estudio en una concentración de proteína equivalente a la de la rodenasa inmovilizada.

El sistema se eluyó posteriormente con 5 volúmenes del mismo buffer, recogiendo los eluidos de la siguiente forma:

- 10 tubos de 0,5 ml
- 10 tubos de 2 ml

A todas las fracciones se les midió la actividad correspondiente, proteínas y azufre lábil.

Por último, la enzima inmovilizada en cada columna se hizo reaccionar con cianuro a la concentración óptima durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Luego, la columna se lavó con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 8,7 recogiendo los siguiente eluidos:

- 6 tubos de 0,2 ml;
- 10 tubos de 1 ml;

en todas las fracciones se midió sulfocianuro.

En cada una de las etapas descriptas se tomó una alícuota de la enzima inmovilizada y se le determinó actividad de rodenasa en presencia de ambos sustratos (tiosulfato + cianuro), de

uno de ellos, o en ausencia de ambos.

En todos los casos se realizaron controles utilizando columnas con rodenasa inmovilizada sometida a las mismas secuencias de reacciones excepto que en lugar de sembrar las enzimas (ALA-S, ALA-D, M-DH) se lavó con buffer. El sulfocianuro eluido de esta columna, luego del pasaje de cianuro, se designará como valor control.

Además, para determinar el efecto del estacionamiento a temperatura ambiente sobre la actividad de las distintas proteínas sembradas, se realizaron controles dejando una alícuota de las mismas durante el tiempo de corrida (30 minutos) a 25 °C; en ellos se midió la actividad enzimática correspondiente.

### II.9.1. Interacción entre rodenasa y ALA-S

Debido a la interrelación entre el camino biosintético del hemo y el metabolismo de sulfocompuestos y considerando además el mecanismo de regulación propuesto para la enzima ALA-S de *Rp. spheroides* según el cual la rodenasa estaría involucrada en la degradación de un polisulfocompuesto activador del ALA-S (descrito en los Capítulos III y IV; Wider de Xifra y col, 1976), se decidió investigar las consecuencias de la interacción entre ambas enzimas.

En la Figura II.28. se describe la secuencia de reactivos empleados para estudiar la modificación de la actividad de ALA-S purificada de *Rp. spheroides* por acción de la rodenasa.

En la Tabla II.10. se detallan los valores de actividad, cantidad de proteína y azufre lábil del ALA-S sembrada y de la fracción eluida luego de interaccionar con rodenasa. De ellos podemos deducir que el pasaje de la enzima a través de la columna conteniendo rodenasa inmovilizada (G-E-S) produjo una dramática pérdida de actividad, concomitante con una disminución del azufre lábil total que podría justificar la inactivación observada.

En la Tabla II.11. se muestran las actividades de rodenasa obtenidas en las distintas etapas descritas en la Figura II.28.

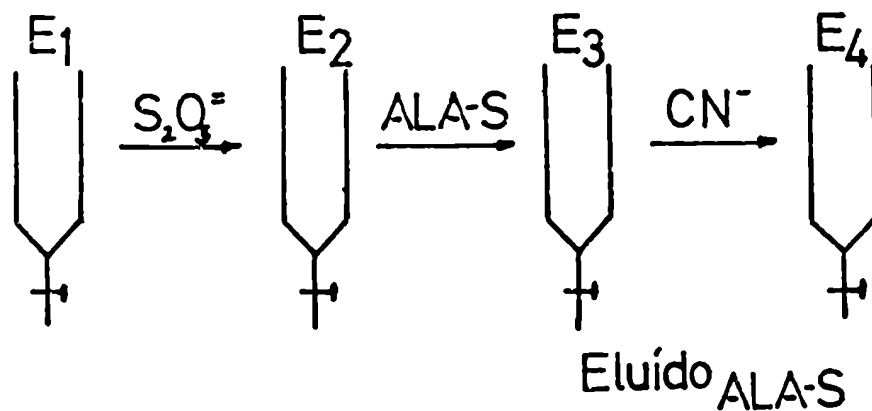


FIGURA II.28.: Interacción entre rodenasa y ALA-S. Se esquematizan las etapas seguidas para estudiar la acción de rodenasa sobre la actividad de ALA-S. E<sub>1</sub> = G-E-S; E<sub>i</sub> (i = 2, 3 y 4) = complejo enzimático formado en cada etapa.

La Figura II.29. muestra el sulfocianuro eluido, luego del agregado de cianuro, por la columna de rodenasa inmovilizada tratada con ALA-S.

El tratamiento de rodenasa inmovilizada (E<sub>1</sub>) con tiosulfato, causó una disminución del 47% de la actividad total resultado coherente con las experiencias descritas en la Sección II.8.1..

La interacción de E<sub>2</sub> con ALA-S produjo la incorporación de azufre resultando un complejo enzimático (E<sub>3</sub>) cuya actividad medida en presencia de ambos sustratos fue algo mayor que la esperada por la pérdida de actividad observada en las experiencias anteriores luego del pasaje de dos reactivos por la columna de enzima inmovilizada.

Por tratamiento con cianuro se obtuvo E<sub>4</sub> cuya actividad fue menor (57%) que la del control correspondiente, pero el sulfocianuro eluido por la columna tratada con ALA-S fue considerablemente mayor que el medido en el caso control. De estos resultados se puede postular que la interacción entre rodenasa y



ALA-S produce la incorporación de azufre en un sitio de la rodé nasa que modifica la reactividad del sitio activo, favoreciendo la liberac ón de una mayor cantidad de producto (luego del pasa- je de cianuro) pero originando una especie enzimática menos ac- tiva. En estas consideraciones es importantetener presente que el ALA-S utilizada fue purificada de células de *Rp. spheroides* crecidas a la luz y que,por lo tanto, contendrían principalmen te ALA-S de alta actividad,lo cual es congruente con los datos obtenidos.

TABLA II.10.: Actividad de ALA-S, proteínas y S lábil luego de la interacción entre rodenasa y ALA-S

FRACCION	ACTIVIDAD DE ALA-S	PROTEINAS	S LABIL
	U <sub>T</sub>	mg <sub>T</sub>	µmoles <sub>T</sub>
Sembrado	304,3	1,74	0,79
Control 30' a T amb.	188,2		
Eluido	6,9	1,79	0,63

Las determinaciones de actividad, proteínas y S lábil se efecuaron de acuerdo a las técnicas descriptas en Materiales y Métodos. La enzima ALA-S se purificó a partir de *Rp. spheroides* según se especifica en Mate- riales y Métodos.

TABLA II.11.: Actividad de rodenasa inmovilizada luego de su interacción con ALA-S

ENZIMA	UNIDADES/ml x 10 <sup>3</sup>				ACTIVIDAD REMANENTE RESPECTO E <sub>1</sub>
	+ S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> + CN <sup>-</sup>	- S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> + CN <sup>-</sup>	+ S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> - CN <sup>-</sup>	- S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> - CN <sup>-</sup>	
	+ buffer	+ buffer	+ buffer	+ buffer	%
E <sub>1</sub>	5,16	0,60	0,00	0,00	100
E <sub>2</sub>	2,72	0,56	0,00	0,00	53
E <sub>3</sub>	2,00	0,38	0,00	0,00	39
E <sub>4</sub>	1,04	0,22	0,16	0,43	20
Control	1,84	0,00	0,00	0,00	36

La determinación de actividad enzimática se realizó de acuerdo a las técnicas detalladas en Materiales y Métodos. E<sub>1</sub> = G-E-S; E<sub>i</sub> (i = 2, 3 y 4) = complejo enzimático formado luego de cada etapa descripta en la Figura II.28. Control: complejo enzimático formado luego del pasaje de tiosulfato, buffer y cianuro a través de la rodenasa inmovilizada.

### II.9.2. Interacción entre rodenasa y ALA-D

La enzima ALA-D, también involucrada en el camino biosintético del hemo, cuyas propiedades fueron descriptas en el Capítulo II, posee grupos -SH en el sitio activo fundamentales para su actividad. En la intoxicación por plomo dichos grupos sulfhidrilos están bloqueados y su actividad sensiblemente disminuida. Considerando la capacidad de sulfotransferasa de rodenasa se decidió estudiar el efecto de la interacción entre rodenasa y ALA-D y la posibilidad de revertir la acción inhibitoria del Pb.

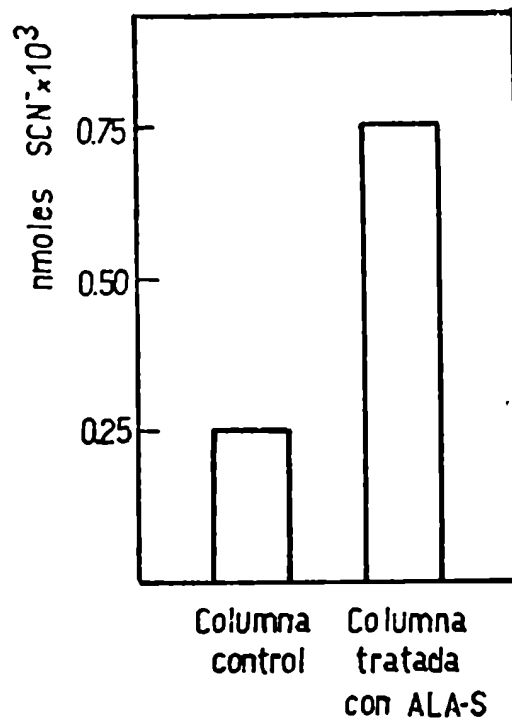


FIGURA II.29.: Estudio comparativo del sulfocianuro liberado por la rodénasa tratada con ALA-S. La determinación de sulfocianuro se realizó según se describe en Materiales y Métodos. Columna control: rodénasa inmovilizada tratada con tiosulfato, buffer y cianuro. Columna tratada con ALA-S: rodénasa inmovilizada y sometida a la secuencia tiosulfato, ALA-S y cianuro.

En la Figura II.30. se describe la secuencia utilizada para investigar la modificación de la actividad de ALA-D purificada de eritrocitos de conejos normales (ALA-D<sub>N</sub>) e intoxicados por Pb (ALA-D<sub>Pb</sub>), por acción de la rodenasa.

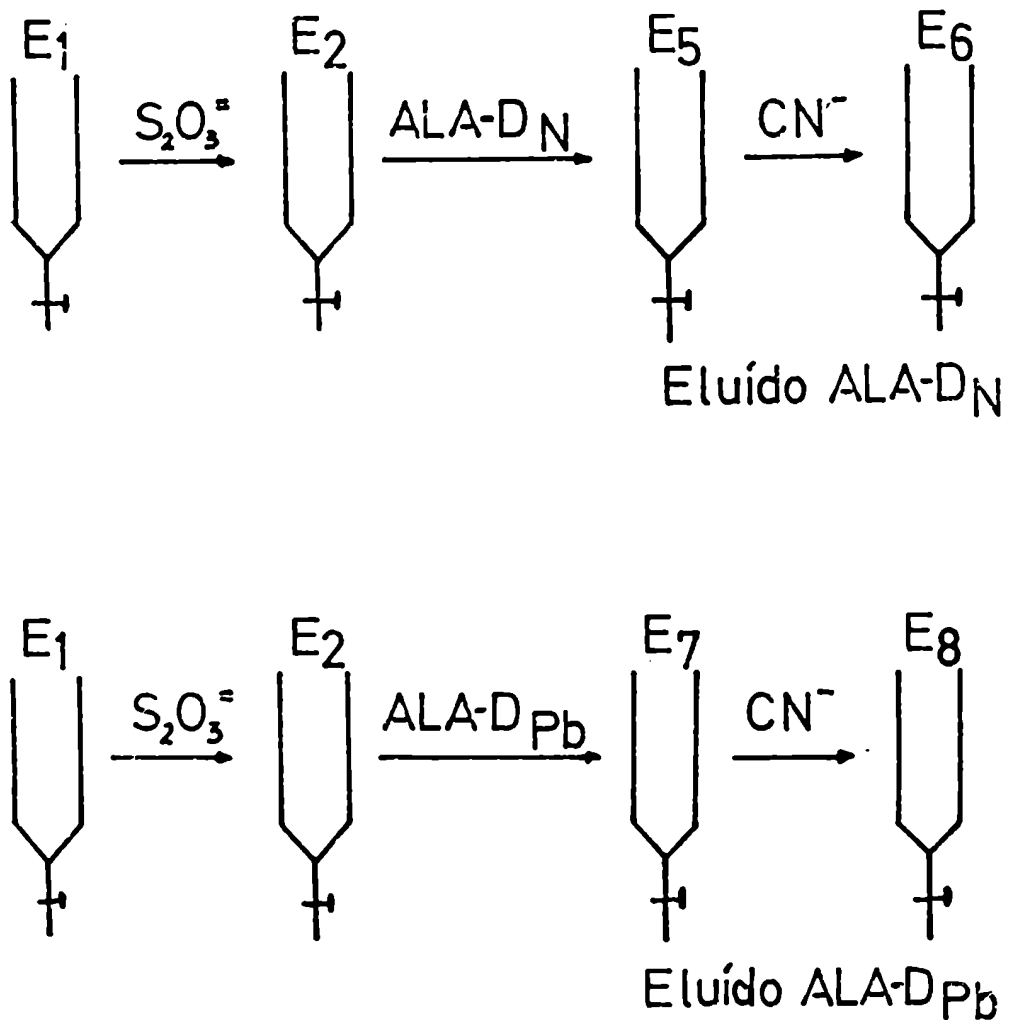


FIGURA II.30.: Interacción entre rodenasa y ALA-D. Se esquematizan las etapas seguidas para estudiar la acción de rodenasa sobre la actividad de ALA-D purificada de eritrocitos de conejos normales (ALA-D<sub>N</sub>) e intoxicados por plomo (ALA-D<sub>Pb</sub>). E<sub>1</sub> = G-E-S; E<sub>i</sub> (i=2, 5, 6, 7 y 8) = complejo enzimático formado en cada etapa.

En la Tabla II.12. se muestran los valores de actividad enzimática, cantidad de proteína y azufre lábil del ALA-D<sub>N</sub> y ALA-D<sub>Pb</sub> sembradas y de las fracciones eluidas luego de la interacción de ambas con rodenasa. De ellos se deduce que el ALA-D<sub>N</sub> perdió un 89% de su actividad mientras que los niveles de ALA-D<sub>Pb</sub> que eran no detectables se incrementaron a valores mayores que los de la enzima aislada de eritrocitos normales y pasada por la columna de rodenasa. Las fracciones eluidas en ambos casos contenían mayor cantidad de azufre lábil.

TABLA II.12.: Actividad de ALA-D, proteínas y S lábil luego de la interacción con rodenasa

FRACCION	ACTIVIDAD DE ALA-D		PROTEINAS		S LABIL	
	U <sub>T</sub>		mg <sub>T</sub>		μmoles <sub>T</sub>	
	N	Pb	N	Pb	N	Pb
Sembrado	125,9	0,00	4,73	2,90	0,62	0,45
Control 30' a T amb.	104,7	0,00	-	-	-	-
Eluido	14,3	31,24	11,77	5,38	1,62	1,16

Las determinaciones de actividad, proteínas y S lábil se efectuaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. N: ALA-D purificada de conejo normal; Pb: ALA-D purificada de conejo intoxicado por Pb. Ambas enzimas se purificaron de acuerdo a la técnica descrita en Materiales y Métodos.

En la Tabla II.13. se detallan los valores de actividad de rodenasa obtenidos en las distintas etapas descritas en la Figura II.30.

TABLA II.13.: Actividad de rodenasa luego de su interacción con ALA-D<sub>N</sub> y ALA-D<sub>Pb</sub>

ENZIMA	UNIDADES/ml x 10 <sup>3</sup>				ACTIVIDAD REMANENTE RESPECTO E <sub>1</sub> %
	+ S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> + CN <sup>-</sup> + buffer	+ S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> - CN <sup>-</sup> + buffer	- S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> + CN <sup>-</sup> + buffer	- S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> - CN <sup>-</sup> + buffer	
E <sub>1</sub>	5,16	0,00	0,60	0,00	100
E <sub>2</sub>	2,72	0,00	0,56	0,00	53
E <sub>5</sub>	4,04	0,00	0,44	0,00	78
E <sub>6</sub>	0,36	1,00	0,80	0,20	7
E <sub>7</sub>	3,32	0,00	0,32	0,00	64
E <sub>8</sub>	0,16	1,84	0,76	0,92	3
Control	1,84	0,00	0,00	0,00	36

La determinación de actividad se realizó según se describe en materiales y Métodos. E<sub>1</sub> = G-E-S; E<sub>i</sub> (i = 2, 5, 6, 7 y 8) = complejo enzimático formado luego de cada etapa descrita en la Figura II.30. Control: complejo enzimático formado luego del pasaje de tiosulfato, buffer y cianuro a través de la rodenasa inmovilizada.

La Figura II.31. muestra el sulfocianuro eluído luego del pasaje de cianuro por las columnas de rodenasa tratadas con ambas preparaciones de ALA-D.

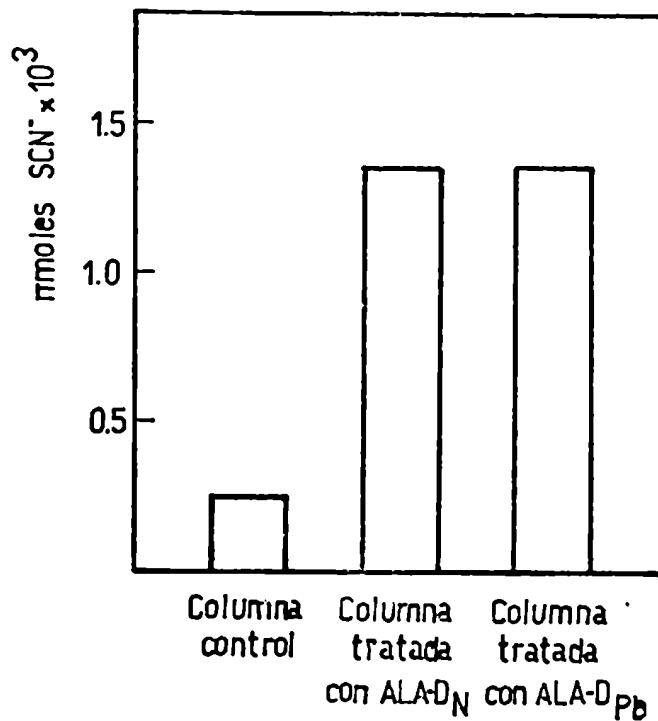


FIGURA II.31.: Estudio comparativo del sulfocianuro liberado por la rodenasa tratada con ALA-D. La determinación de sulfocianuro se realizó según se describe en Materiales y Métodos. Columna control: rodenasa inmovilizada tratada con tiosulfato, buffer y cianuro. Columna tratada con ALA-D<sub>N</sub> o ALA-D<sub>Pb</sub>: rodenasa inmovilizada y sometida a las secuencias descritas en la Figura II.30.

El pasaje de ALA-D<sub>N</sub> o ALA-D<sub>Pb</sub> a través de la rodenasa inmovilizada (E<sub>1</sub>) y tratada con tiosulfato (E<sub>2</sub>) produjo formas enzimáticas (E<sub>5</sub> y E<sub>7</sub>) con actividad de rodenasa mayor que E<sub>2</sub>. Esto podría interpretarse suponiendo que el ALA-D actuó como un aceptor de azufre creándose una situación análoga a la descrita en la sección II.8.1.

El pasaje de cianuro por ambas columnas liberó cantidades importantes del producto sulfocianuro, mucho mayor al obtenido en el caso control. Sin embargo, los complejos enzimáticos resultantes E<sub>6</sub> y E<sub>8</sub> mantenían solamente un 7% y 3% de su actividad original cuando eran incubados en presencia de ambos sustratos. Pero la formación de producto era significativa si dichos complejos enzimáticos se incubaban con cada sustrato por separado o aún en ausencia de los mismos, indicando que evidentemente se encuentran retenidos en algún sitio de la proteína, lo cual podría provocar ciertas deformaciones del sitio activo, de manera que cuando se incubara la enzima en presencia de ambos sustratos, se produciría como una sobrecarga de los mismos, no se podría recuperar la conformación óptima y en consecuencia la actividad sería menor.

### II.9.3. Interacción entre rodenasa y M-DH

La málico-deshidrogenasa (M-DH) pertenece al grupo de las ferrosulfoproteínas mitocondriales que requieren azufre para manifestar su máxima actividad enzimática. Como se describió en la sección V.6.3. la rodenasa aislada de hígado bovino es capaz de modificar la actividad de M-DH en presencia de tiosulfato, actuando en este caso como sulfotransferasa.

En base a estos antecedentes se decidió investigar la interacción entre rodenasa inmovilizada y M-DH purificada de músculo pectoral de paloma.

En la Figura II.32. se describe la secuencia utilizada para estudiar dicha interacción.

En la Tabla II.14. se detallan los valores de actividad enzimática, cantidad de proteína y azufre lábil de M-DH sembrada y de la fracción eluida luego del pasaje a través de la columna de rodenasa inmovilizada. De estos datos se deduce que la



M-DH pierde un 84% de su actividad original concomitantemente con una disminución del 82% de su contenido de azufre lábil.

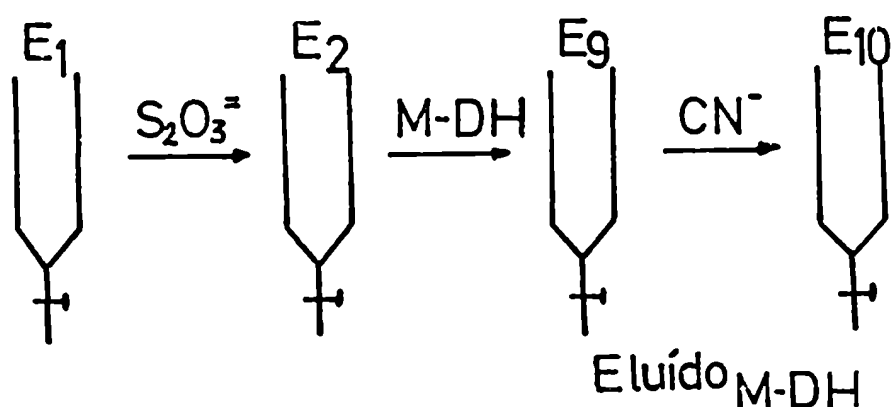


FIGURA II.32.: Interacción entre rodenasa y M-DH.  
Se esquematizan las etapas seguidas para estudiar la acción de rodenasa sobre la actividad de M-DH purificada de músculo pectoral de paloma.  $E_1 = G-E-S$ ;  $E_i = (i = 2, 9 \text{ y } 10) \pm$  complejo enzimático formado en cada etapa.

En la Tabla II.15. se muestran los valores de actividad de rodenasa obtenidos en las distintas etapas descritas en la Figura II.32.

La Figura II.33. muestra el sulfocianuro eluido luego del pasaje de cianuro por la columna de rodenasa tratada con la solución de M-DH.

De todos estos datos se comprueba que el pasaje de málico-deshidrogenasa por la columna conteniendo rodenasa inmovilizada produjo una forma enzimática ( $E_9$ ) de mucha mayor actividad que la original ( $E_1$ ). Además  $E_9$ , incubada únicamente en presencia de cianuro, formó mayor cantidad de producto (1.120 nmoles de sulfocianuro/ml), indicando ésto que el complejo enzimático  $E_9$  retenía más azufre que el complejo G-E-S. El tratamiento con cianuro y las posteriores incubaciones de la nueva forma enzimá

tica obtenida ( $E_{10}$ ) en presencia de ambos sustratos o de cada uno de ellos permitió comprobar que el cianuro también quedaba retenido formando un complejo enzimático intermedio, ya que por incubación de  $E_{10}$  en ausencia de este sustrato se obtenía alta actividad (1.920 nmoles  $SCN^-/ml$ ). Incluso por incubación de  $E_{10}$  en ausencia de ambos sustratos se detectó producto, avalando ésto la formación de un complejo enzimático, que actuaría como intermediario conteniendo azufre y cianuro en su estructura.

TABLA II.14.: Actividad de M-DH, proteínas y S lábil  
luego de la interacción entre rodenasa y  
M-DH

FRACCION	ACTIVIDAD DE M-DH	PROTEINAS	S LABIL
	$U_T$	$mg_T$	$\mu moles_T$
Sembrado	66,0	3,35	1,61
Control 30' a T amb.	66,0		
Eluído	10,9	2,43	0,30

Las determinaciones de actividad, proteínas y S lábil se efectuaron de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos.

TABLA II.15.: Actividad de rodenasa luego de su interacción con M-DH

ENZIMA	UNIDADES/ml x 10 <sup>3</sup>				ACTIVIDAD REMANENTE RESPECTO E <sub>1</sub>
	+ S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> + CN <sup>-</sup>	+ S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> - CN <sup>-</sup>	- S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> + CN <sup>-</sup>	- S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> - CN <sup>-</sup>	%
	+ buffer	+ buffer	+ buffer	+ buffer	
E <sub>1</sub>	5,16	0,00	0,60	0,00	100
E <sub>2</sub>	2,72	0,00	0,56	0,00	53
E <sub>9</sub>	6,80	0,00	1,12	0,00	131
E <sub>10</sub>	4,40	1,92	0,84	1,30	85
Control	1,84	0,00	0,00	0,00	36

La determinación de actividad se realizó según se describe en Materiales y Métodos. E<sub>1</sub> = G-E-S; E<sub>i</sub> (i = 2, 9, 10) = complejo enzimático formado luego de cada etapa descripta en la Figura II.32.. Control: complejo enzimático formado luego del pasaje de tiosulfato, buffer y cianuro a través de la rodenasa inmovilizada.

El sulfocianuro eluido luego del tratamiento con cianuro fue superior al obtenido en el caso control, justificando también este dato que el azufre cedido por la M-DH fue captado por la rodenasa formando un complejo estable.

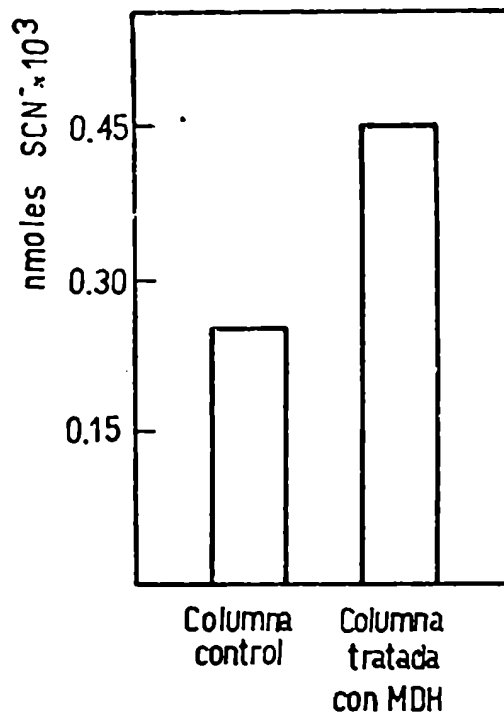


FIGURA II.33.: Estudio comparativo del sulfocianuro liberado por la rodenasa tratada con M-DH. La determinación de  $\text{SCN}^-$  se realizó según se describe en Materiales y Métodos. Columna control: rodenasa inmovilizada tratada con tiosulfato, buffer y cianuro. Columna tratada con M-DH: rodenasa inmovilizada y sometida a la secuencia descrita en la Figura II.32.

La rodenasa puede asociarse con hierro-sulfoproteínas dando complejos no covalentes, con alteración de su estructura y probablemente de su sitio activo, afectándose especialmente la capacidad apolar del mismo (Volini y col, 1977; Horowitz y Criscimagna, 1983). La modificación de la apolaridad del sitio activo produce cambios en la actividad de la enzima (Horowitz y Criscimagna, 1983).

Es por lo tanto probable que la M-DH retenida por la columna de rodenasa inmovilizada (disminución de la proteína eluida, Tabla II.14.) se haya asociado a la misma, a través de interacciones apolares, produciendo una nueva estructura de mayor capacidad catalítica.

Si hacemos extensivo este mismo razonamiento a lo observado en el caso del pasaje del ALA-D a través de la columna de rodenasa, recordemos que se elufa mayor cantidad de proteína, de manera que podría haber sucedido que parte de la rodenasa se hubiera disociado y hubiera eluido unida al ALA-D.

## II. 10. CONCLUSIONES

- Se determinaron las condiciones óptimas para la extracción y medición de actividad de rodenasa en *Rp. palustris*.
- Se investigó la presencia de rodenasa en las distintas fracciones obtenidas luego de sonicar el tejido y someterlo a una centrifugación a 25.000 x g, comprobándose que la enzima se encontraba fundamentalmente en la fracción sobrenadante.
- Se desarrolló una metodología que permitió obtener una enzima purificada 24 veces.
- Por pasaje a través de una columna de Sephadex G-100 se comprobó que la rodenasa proveniente de *Rp. palustris* tenía un PM de 16.500.
- Se determinaron las condiciones para inmovilizar la enzima sobre geles de Sepharosa 4 B estableciéndose que el agregado de tiosulfato de sodio 1 mM durante el proceso de acople, era requisito fundamental para obtener una preparación inmovilizada activa.
- Se analizó la estabilidad del complejo gel-enzima en función del tiempo de estacionamiento y del uso repetido de una misma fracción enzimática.
- Se efectuó un estudio comparativo de la rodenasa soluble e insolubilizada con respecto a concentración proteica, tiempo, temperatura y pH óptimos de incubación.
- Se realizó el estudio cinético de la enzima soluble, observándose y analizándose detalladamente efecto inhibitorio a elevadas concentraciones de ambos sustratos; el producto sulfito también resultó inhibitorio, mientras que el agregado del otro producto de la reacción (sulfocianuro) al sistema de incubación aumentó la velocidad del mismo.  
La enzima presentó un comportamiento michaeliano.  
En base a los resultados obtenidos se podría postular que la reacción catalizada por rodenasa sigue un mecanismo ping-pong con una forma enzimática estable (E) y otra inestable (E-S).
- Sobre la rodenasa insolubilizada se efectuaron estudios cinéticos similares a los descriptos en el párrafo anterior. Se comprobó que esta enzima presentaba un comportamiento distinto,

pues era sigmoideo con cooperatividad positiva para ambos sustratos.

- Con la enzima inmovilizada se realizaron experiencias para tratar de determinar la secuencia de reacción de los sustratos y además aislar posibles intermediarios. Con los datos obtenidos se postula un probable mecanismo químico de la reacción.
- Para establecer el verdadero rol biológico de la rodenasa se realizaron estudios tendientes a confirmar su actividad de sulfotransferasa y en función de ésta, su capacidad para modificar la actividad de tres enzimas sulfhidríflicas: ALA-S, ALA-D y M-DH.

REFERENCIAS

- Horowitz, P.M. & Criscimagna, N.L. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 111, 595.
- Neuberger, A.; Sandy, J.D. & Tait, G. (1973) *Biochem. J.* 136, 477.
- Viale, A.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 729.
- Volini, M.; Craven, D. & Ogata, K. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 79, 980.
- Wider de Xifra, E.A.; Sandy, J.D.; Davies, R. & Neuberger, A. (1976) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 273, 79.



RODENASA DE ERITROCITOS HUMANOS

---

	Página
III.1. Determinación de las condiciones óptimas para la medición de rodenasa en sangre	319
III.1.1. Concentración proteica	319
III.1.2. Tiempo óptimo de incubación	319
III.1.3. Estabilidad de rodenasa por estaciona <u>m</u> iento de glóbulos rojos	320
III.1.4. Determinación de las concentraciones óptimas de los sustratos. Cinética de la reacción	321
III.2. Actividad de rodenasa y ALA-S en eritrocitos de individuos normales y porfíricos	323
III.2.1. Actividad de rodenasa en hombres y mujeres normales	324
III.2.2. Actividad de rodenasa en hombres y mujeres con distintas porfirias	325
III.2.3. Actividad de ALA-S en individuos normales y porfíricos	325
III.3. Estudio comparativo de rodenasa aislada de eritrocitos de individuos normales y porfíricos	330
III.3.1. Purificación de rodenasa de glóbulos rojos humanos (GRH)	330
III.3.2. Comparación del peso molecular de la rodenasa purificada de GR de individuos normales y porfíricos	331
III.4. Estudio comparativo de las propiedades de rodenasa purificada de GRHN y GRHPAI	337

	Página
III.4.1. pH óptimo de incubación	337
III.4.2. Estudios cinéticos de la enzima puri ficada de eritrocitos humanos	337
III.5. Conclusiones	345
Referencias	346

### III. RODENASA DE ERITROCITOS HUMANOS

Considerando que en las porfirias ocurren fallas enzimáticas primarias específicas para cada tipo y que existe además, generalmente, un aumento secundario del ALA-S, se decidió investigar la posible existencia de una correlación entre ALA-S y rodenasa en organismos animales, empleando eritrocitos de individuos normales y pacientes con diferentes clases de porfirias. Para estos fines fue necesario determinar previamente las condiciones óptimas para la determinación de rodenasa en eritrocitos humanos.

#### III.1. DETERMINACION DE LAS CONDICIONES OPTIMAS PARA LA MEDICION DE RODENASA EN SANGRE

##### III.1.1. Concentración proteica

Se estudió el efecto de la concentración proteica empleando sangre de individuos normales (en este caso, mujeres adultas).

Los eritrocitos hemolizados por congelamiento y descongelamiento se diluyeron 5, 10, 15 y 30 veces, con buffer Tris - ClH 0,05 M pH 7,4.

Los valores de actividad obtenidos se representan en la Figura III.1.; la dilución 1/15 resultó la más práctica para las determinaciones de actividad y fue la utilizada en todas las experiencias posteriores.

##### III.1.2. Tiempo óptimo de incubación

Utilizando la dilución 1/15 para los eritrocitos hemolizados, de varias mujeres normales, se incubó la enzima a intervalos variables (30, 60, 90 y 120 minutos).

Se observó que existía una relación lineal entre la formación de producto y el tiempo creciente de incubación, adoptándose el período de 30 minutos como tiempo standard de incubación (Figura III.2.)

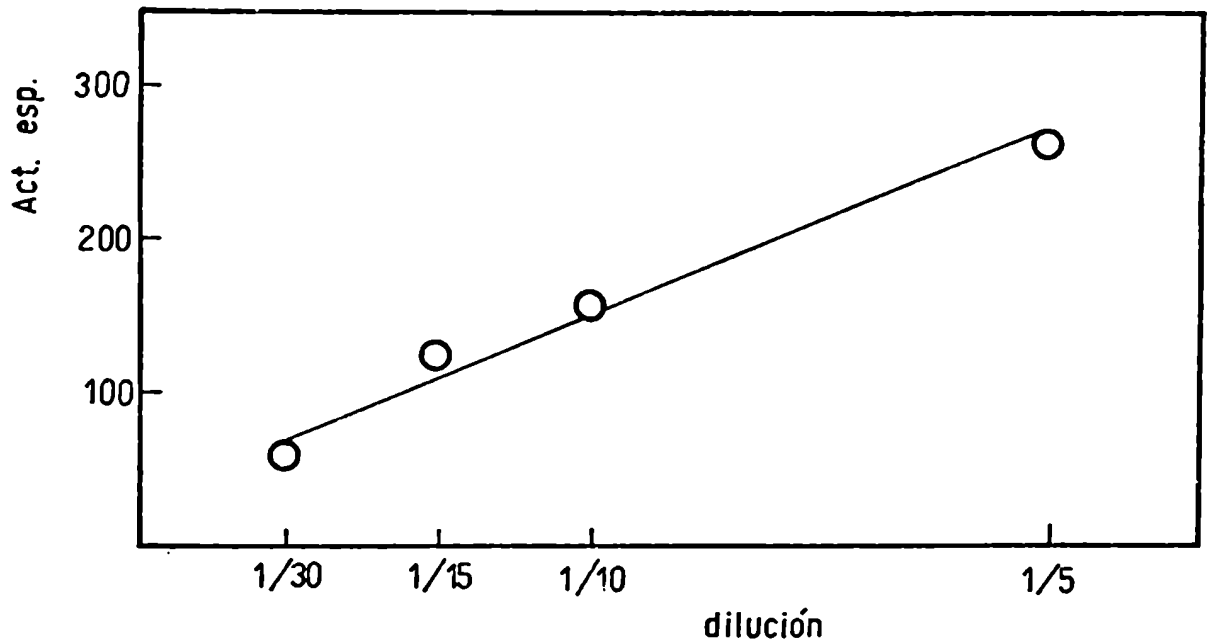


FIGURA III.1.: Efecto de la concentración proteica. Los GR se hemolizaron por congelamiento y descongelamiento, 3 veces. La dilución se efectuó con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,4. Las mediciones de actividad se realizaron de acuerdo con las técnicas descritas en Materiales y Métodos.

### III.1.3. Estabilidad de rodenasa por estacionamiento de glóbulos rojos

Se investigó la estabilidad de la enzima por estacionamiento de los eritrocitos provenientes de hombres y mujeres mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  luego de hemolizarlos o bien luego de diluir el hemolizado (dilución 1/15).

En la Figura III.3. puede verse que es más conveniente, si fuera necesario, congelar los glóbulos rojos hemolizados sin diluir, ya que en estas condiciones la enzima presenta mayor estabilidad.

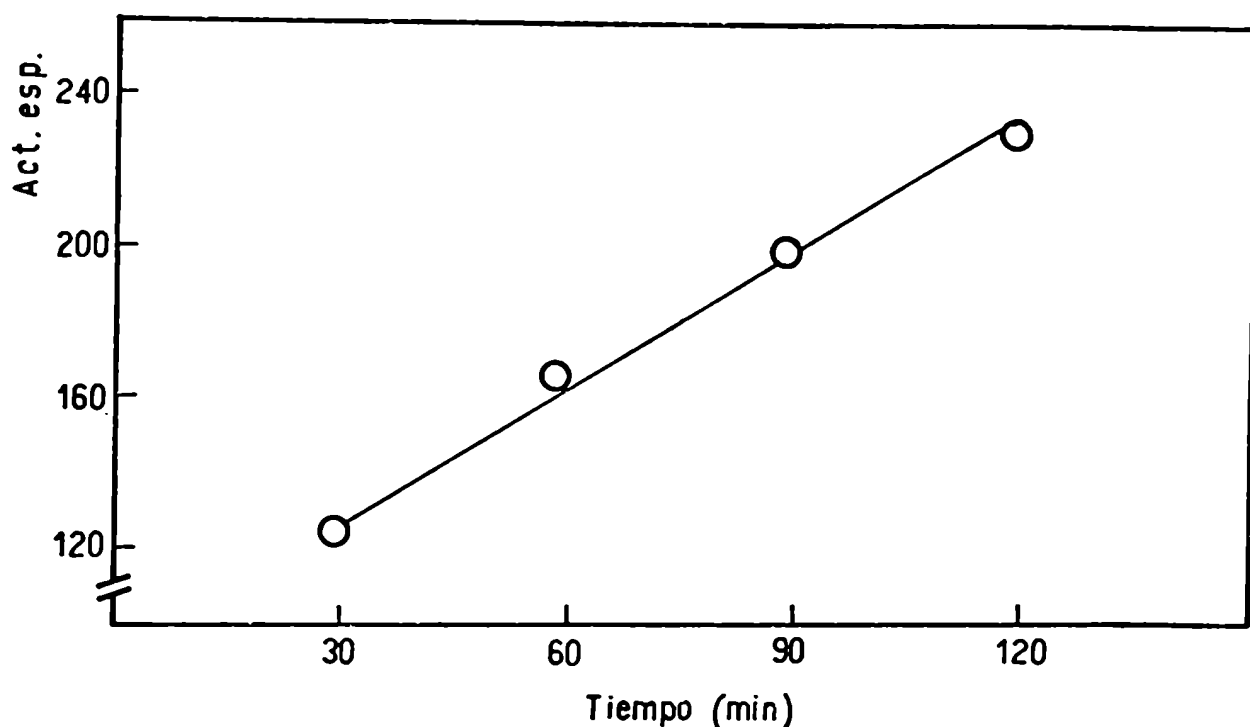


FIGURA III.2.: Efecto del tiempo de incubación. Las condiciones experimentales y técnicas utilizadas son las detalladas en el texto y en Materiales y Métodos.

#### III.1.4. Determinación de las concentraciones óptimas de los su- stratos. Cinética de la reacción

Se determinó la velocidad de formación del producto sulfofocianuro en función de la variación de la concentración de uno de los sustratos (entre 1 y 150 mM) y manteniendo la del otro constante (50 mM).

Las Figuras III.4 y III.5 muestran las curvas obtenidas cuando el sustrato variable utilizado fue  $S_2O_3^{=}$  y  $CN^-$ . En ambos gráficos puede observarse inhibición por sustrato luego del punto de saturación, más pronunciada y rápida para el cianuro. Ambas curvas son del tipo michaeliano, esto fue corroborado por la linealidad de sus gráficos de dobles recíprocos. A partir de ellos se calcularon los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  (Tabla III.1.). Es-

tas experiencias se hicieron con sangre proveniente de dos individuos distintos, obteniéndose los mismos valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  para ambos sustratos.

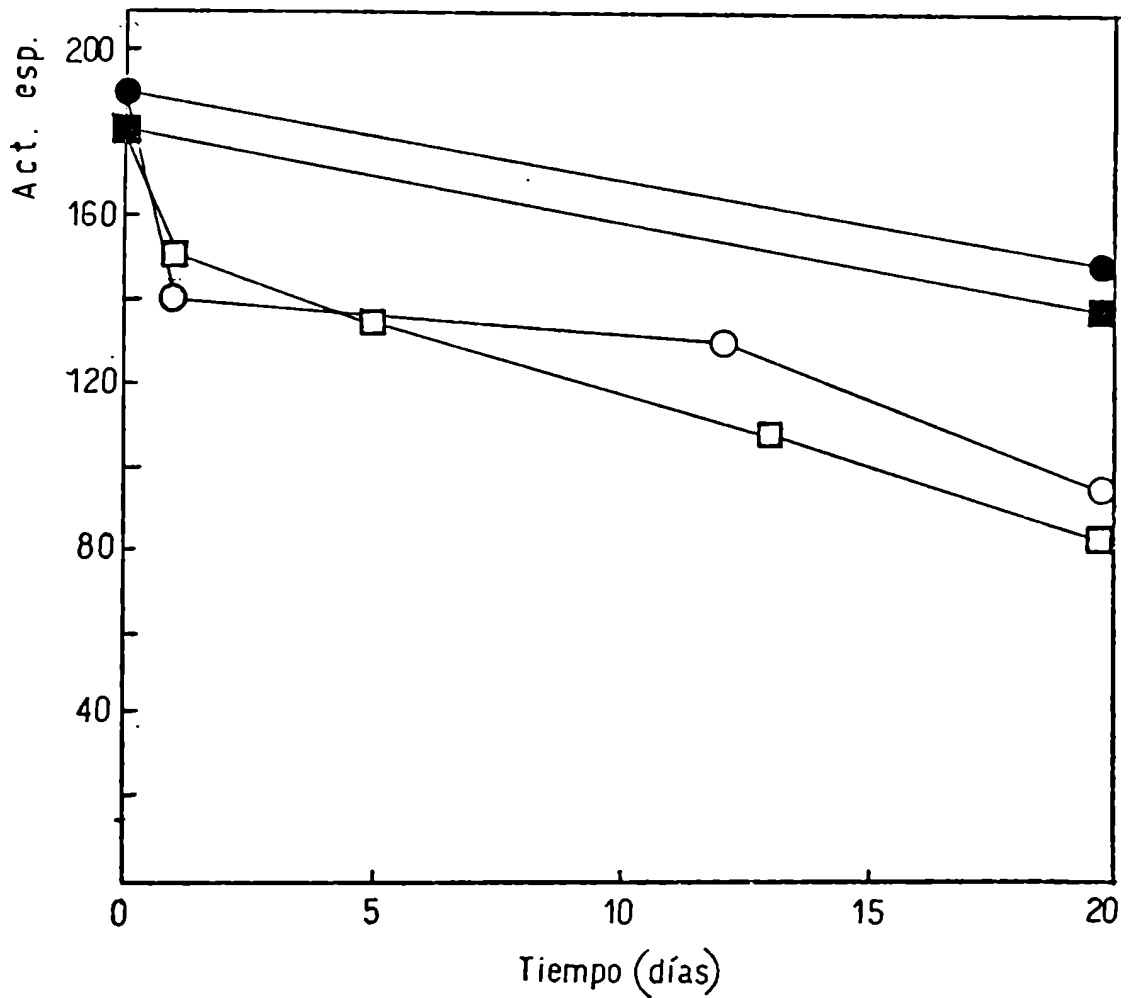


FIGURA III.3.: Estabilidad por estacionamiento.  
Se mantuvo la sangre hemolizada, congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$  proveniente de: Mujer: diluída (1/15) (○) y sin diluir (●). Hombre: diluída (1/15) (□) y sin diluir (■).  
Las mediciones se realizaron de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos.

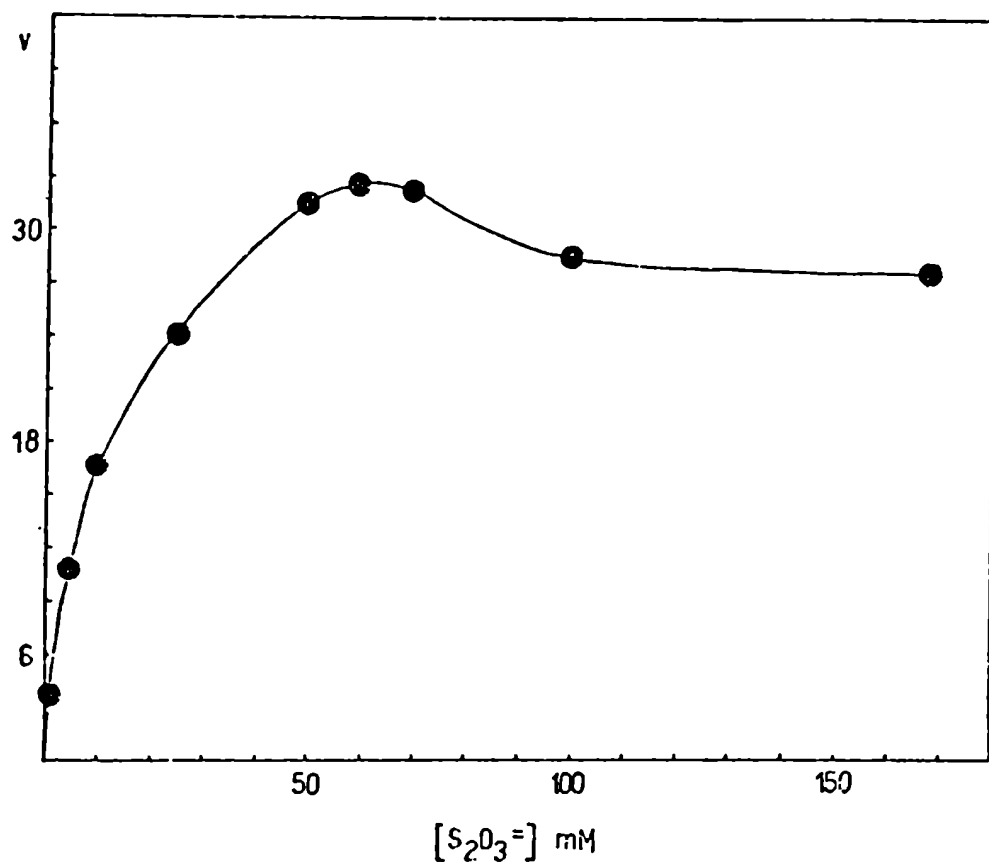


FIGURA III.4.: Cinética de rodenasa en función de la concentración de tiosulfato. La concentración de cianuro se mantuvo constante (50 mM). Las mediciones de formación de producto se realizaron de acuerdo a lo detallado en Materiales y Métodos.  
 (v): nmoles SCN<sup>-</sup> x 10<sup>3</sup>/30'; (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>): mM  
 Km: 20 mM; Vmax: 33 μmoles SCN<sup>-</sup>/30'

### III.2. ACTIVIDAD DE RODENASA Y ALA-S EN ERITROCITOS DE INDIVIDUOS NORMALES Y PORFIRICOS

Para determinar el posible rol regulatorio de rodenasa sobre ALA-S y de este modo la interconexión entre el camino metabólico de los sulfocompuestos y la biosíntesis del hemo, se estudiaron los niveles de ambas enzimas en individuos normales y porfiricos.

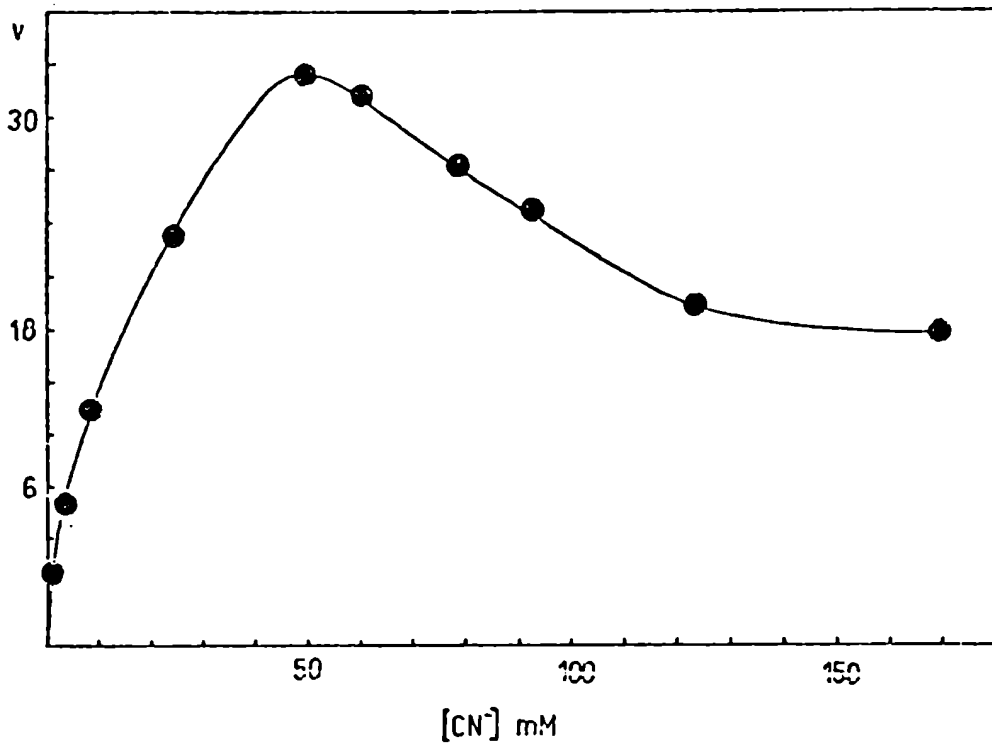


FIGURA III.5.: Cinética de rodenasa en función de la concentración de cianuro. La concentración de tiosulfato se mantuvo constante (50 mM). Las determinaciones de actividad se realizaron de acuerdo a Materiales y Métodos. (v): nmoles  $\text{SCN}^- \times 10^3/30'$  ( $\text{CN}^-$ ): mM.  $K_m$ : 20 mM;  $V_{max}$  33  $\mu\text{moles SCN}^-/30'$

### III.2.1. Actividad de rodenasa en hombres y mujeres normales

Establecidas las condiciones óptimas para la detección de rodenasa, se realizaron mediciones de la actividad de esta enzima en eritrocitos de mujeres y hombres adultos normales. La Figura III.6. muestra los resultados obtenidos; el valor medio hallado para mujeres es 127 nmoles  $\text{SCN}^-/\text{mg}$  proteína y para hombres 112 nmoles  $\text{SCN}^-/\text{mg}$  proteína.



TABLA III.1.: Parámetros cinéticos para rodenasa

PARAMETRO CINETICO	SUSTRATO VARIABLE	
	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup>	CN <sup>-</sup>
Vmax (μmoles SCN <sup>-</sup> /30 min)	33	33
Km (mM)	20	20

Los valores de Km y Vmax fueron determinados a partir de los gráficos de Lineweaver-Burk realizados con los datos de velocidades mostrados en las curvas de saturación (Figuras III.4. y III.5.).

### III.2.2. Actividad de rodenasa en hombres y mujeres con distintas porfirias

Se efectuaron estudios con numerosos pacientes adultos, de ambos sexos, con diferentes tipos de Porfirias; de todos los valores obtenidos se pudo comprobar que en los casos de PCT, PAI, PV e intoxicación con Pb los niveles de actividad media de rodenasa fueron significativamente menores que las medias normales correspondientes, mientras que para los pacientes con PPE, la media fue del mismo orden que el valor normal (Figura III.7.).

### III.2.3. Actividad de ALA-S en individuos normales y porfíricos

Como ya se mencionó previamente, para tratar de establecer alguna relación entre niveles de rodenasa y ALA-S, se estudiaron simultáneamente los valores de actividad de ALA-S en la sangre del mismo grupo de individuos a los cuales se les midió actividad de rodenasa.

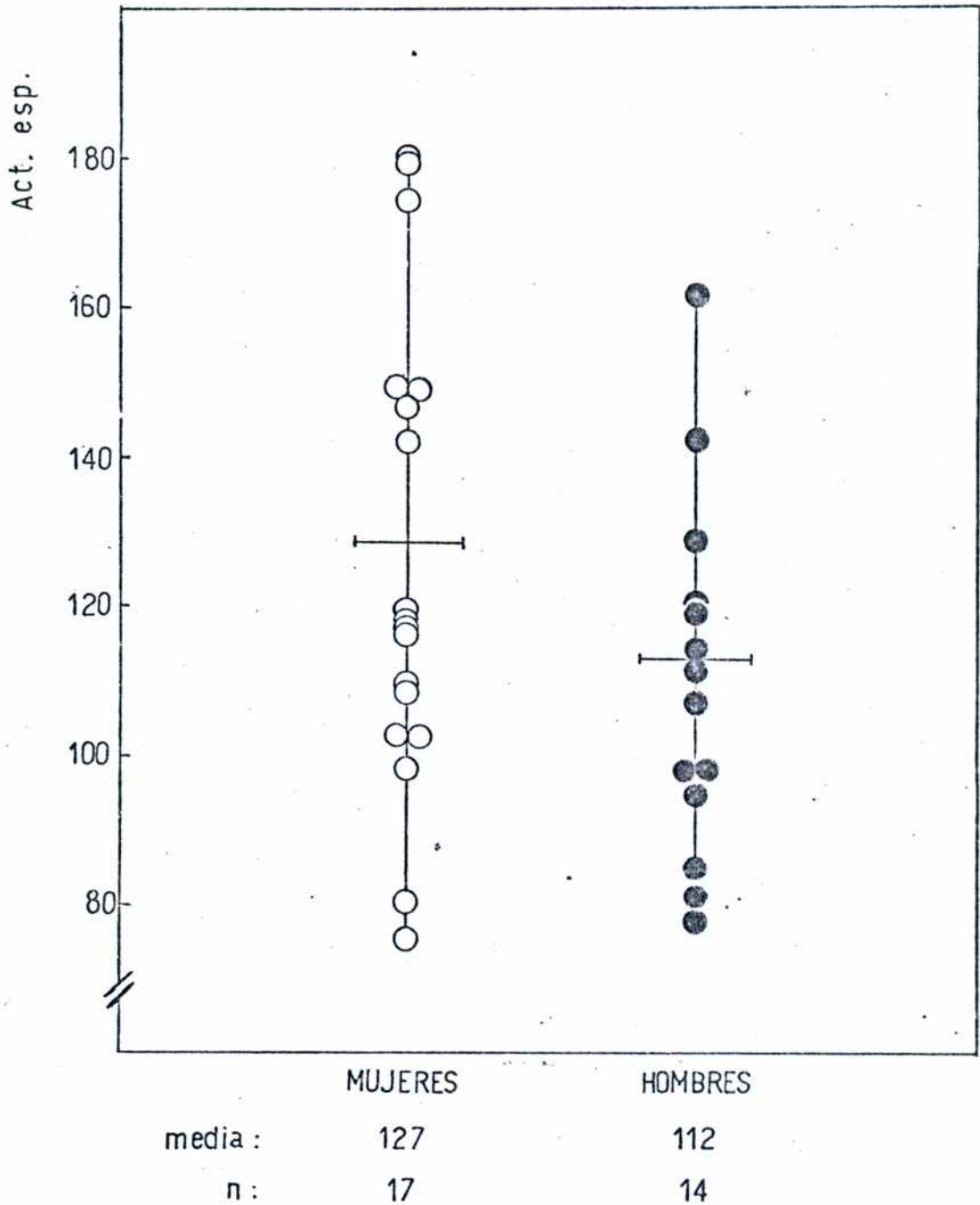


FIGURA III.6.: Actividad de rodenasa en individuos normales. Las determinaciones de actividad se realizaron según los procedimientos detallados en Materiales y Métodos.

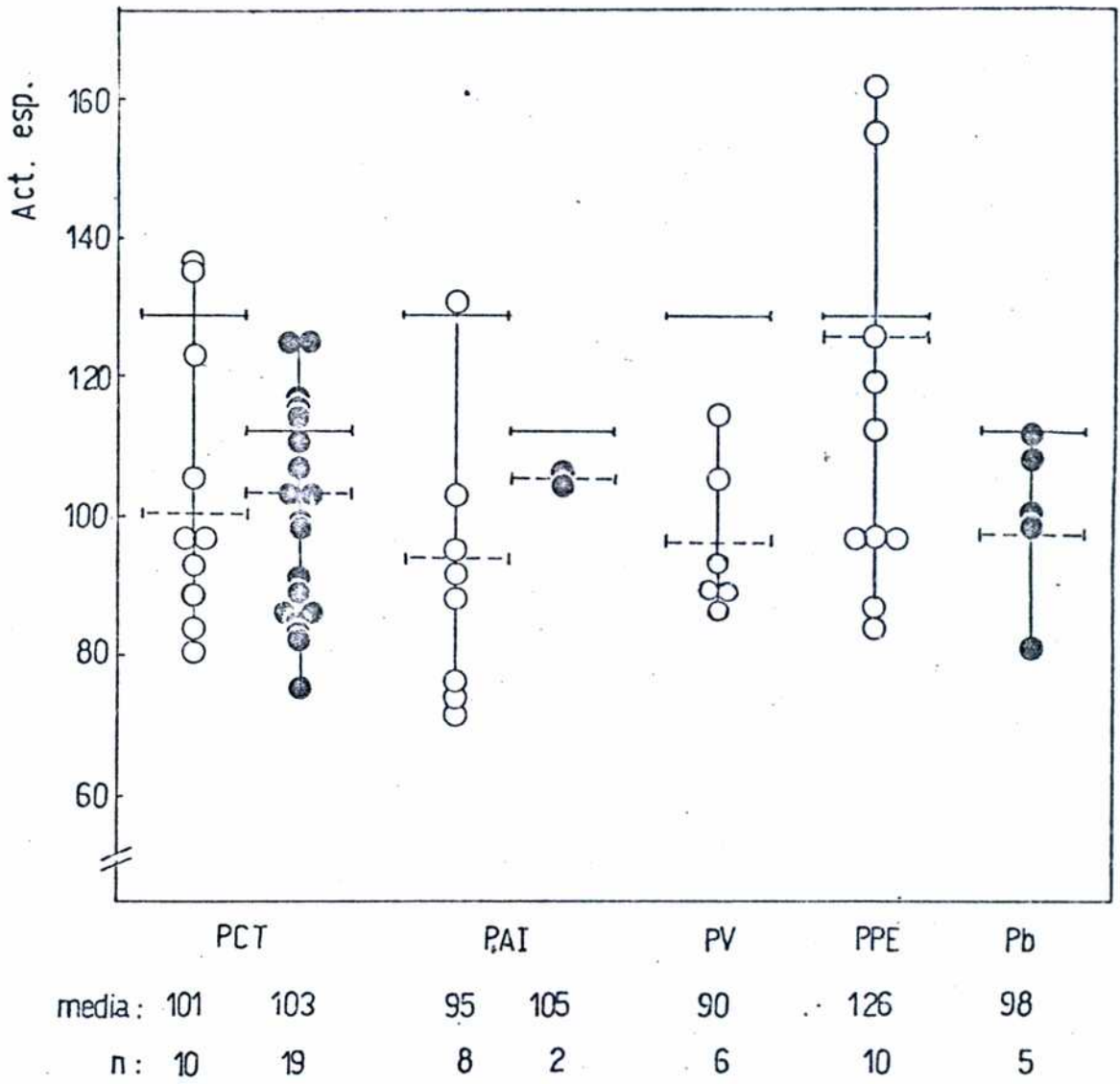


FIGURA III.7.: Actividad de rodenasa en individuos porfíricos.

(○) mujeres; (●) hombres; (—) media normal; (--) media porfíricos.

Las determinaciones de actividad se realizaron de acuerdo a los procedimientos descritos en Materiales y Métodos.

De los datos descriptos en la Tabla III.2. puede comprobarse que en PCT, PAI, PV e intoxicación por plomo, la actividad de la enzima ALA-S estaba aumentada, resultando llamativo que en PPE los niveles eran normales.

TABLA III.2.: Actividad de ALA-S en individuos normales y porfíricos

INDIVIDUOS	ALA-S
	nmoles ALA/h/mg
Normales	.0,270
PCT	30,500
PAI	4,050
PV	2,700
PPE	0,269
Pb	1,350

La determinación de actividad de ALA-S se realizó según los procedimientos descriptos en Materiales y Métodos.

Es muy interesante un análisis comparativo de todos estos datos, por cuanto se comprueba que existiría una correlación entre las actividades de rodenasa y ALA-S, ya que en todos aquellos casos en los cuales se detecta un incremento de esta última, existe una correspondiente disminución de la rodenasa; apoyando esta teoría, se encuentra además, que en la PPE, en la cual no se observa variación en la actividad de ALA-S, tampoco hay modificación en los niveles de rodenasa.

Estos resultados permitirían postular que también en organismos animales podría operar un mecanismo de control de la actividad de ALA-S interconectado con enzimas del metabolismo del azufre, similar al propuesto para *Rp. spheroides* (Wider y col, 1976).

Si aceptamos que uno de los roles de la rodenasa es degradar sulfocompuestos, que éstos son activadores del ALA-S y responsables de los incrementos de actividad observados en los casos de porfiria, los bajos valores de rodenasa hallados en sangre de pacientes que padecen estas enfermedades serían coherentes con una baja degradación del activador del ALA-S y por ende, con un alto valor de la actividad de esta enzima.

### III.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE RODENASA AISLADA DE ERITROCITOS DE INDIVIDUOS NORMALES Y PORFIRICOS

Con el objeto de justificar las diferencias en los niveles de rodenasa hallados en individuos normales y porfíricos, se decidió encarar un estudio comparativo de esta enzima aislada y purificada a partir de eritrocitos de individuos normales y de una paciente con porfiria aguda intermitente.

#### III.3.1. Purificación de rodenasa de glóbulos rojos humanos (GRH)

##### - Tratamiento con solventes orgánicos

La primera etapa de la purificación se realizó de acuerdo con el método de Bustos y col (1980). Para ello, los GR se lavaron con solución fisiológica y se llevaron a pH 8, con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado. Luego se les agregó una mezcla fría (a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) de n-butanol y cloroformo (1:0,4 v/v) en la relación de 1 volumen de GR a 0,2 volúmenes de mezcla, con agitación mecánica continua.

Se continuó agitando durante 15 minutos manteniendo la temperatura entre  $4 - 6\text{ }^\circ\text{C}$ .

La mezcla resultante se dejó 60 minutos en reposo y luego se la centrifugó a  $24.000 \times g$  durante 20 minutos. El sobrenadante fue dializado durante 20 horas con buffer fosfato de sodio  $0,01\text{ M}$  pH 6,8 (1:200 v/v). Mediante este tratamiento se eliminó alrededor del 96% de la hemoglobina obteniéndose una rodenasa purificada 24 veces.

##### - Fraccionamiento con sulfato de amonio

El sobrenadante dializado se fraccionó con sulfato de amonio. Comprobándose que la fracción 45-65% de saturación contenía la máxima actividad específica de rodenasa. Esta fracción contenía a la enzima purificada 67 veces, con un rendimiento del 50% respecto del control.

En la Tabla III.3. se resumen los resultados obtenidos.

TABLA III.3.: Purificación de rodenasa de GRHN

FRACCION	VOL.	U/ml x 10 <sup>3</sup>	U <sub>i</sub> x 10 <sup>3</sup>	mg PROT/ml	ACT.ESP. x 10 <sup>3</sup>	PURIF.	REND.%
Control	44,0	31,88	1.403	259,07	0,123	1	100
Dializado	22,5	48,20	1.085	16,34	2,950	24	70
45-65%	4,0	175,75	703	21,47	8,186	67	50

Control: GR hemolizados por 3 sucesivos congelamientos.  
 Dializado: es el sobrenadante del tratamiento con solventes orgánicos y posterior diálisis. Las determinaciones de actividad y contenido de proteínas se realizaron según se detalla en Materiales y Métodos.

III.3.2. Comparación del peso molecular de la rodenasa purificada de GR de individuos normales y porfíricos

El precipitado obtenido luego de la purificación de la enzima por fraccionamiento con sulfato de amonio, se resuspendió en buffer Tris-ClH 0,05 M pH 8,7 y se sembró en una columna de Sephadex G-100, eluyéndose con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,5, se recogieron fracciones de 2,5 ml y a cada una de ellas se les determinó actividad enzimática y contenido de proteínas.

En la Figura III.8. puede verse la curva de elución correspondiente a la enzima purificada a partir de sangre de personas normales. Se obtuvo un único pico de actividad correspondiente a un peso molecular de 33.000.

Las Figuras III.9. y III.10. muestran los perfiles de elución para la enzima purificada de sangre de pacientes con porfiria cutánea tarda (PCT) y porfiria aguda intermitente (PAI), respectivamente. En ambos casos se obtuvo también un único pico y los pesos moleculares, calculados de la curva de calibración correspondiente (Figura III.11.), resultaron ser: 28.000 para PCT y 33.000 para PAI.

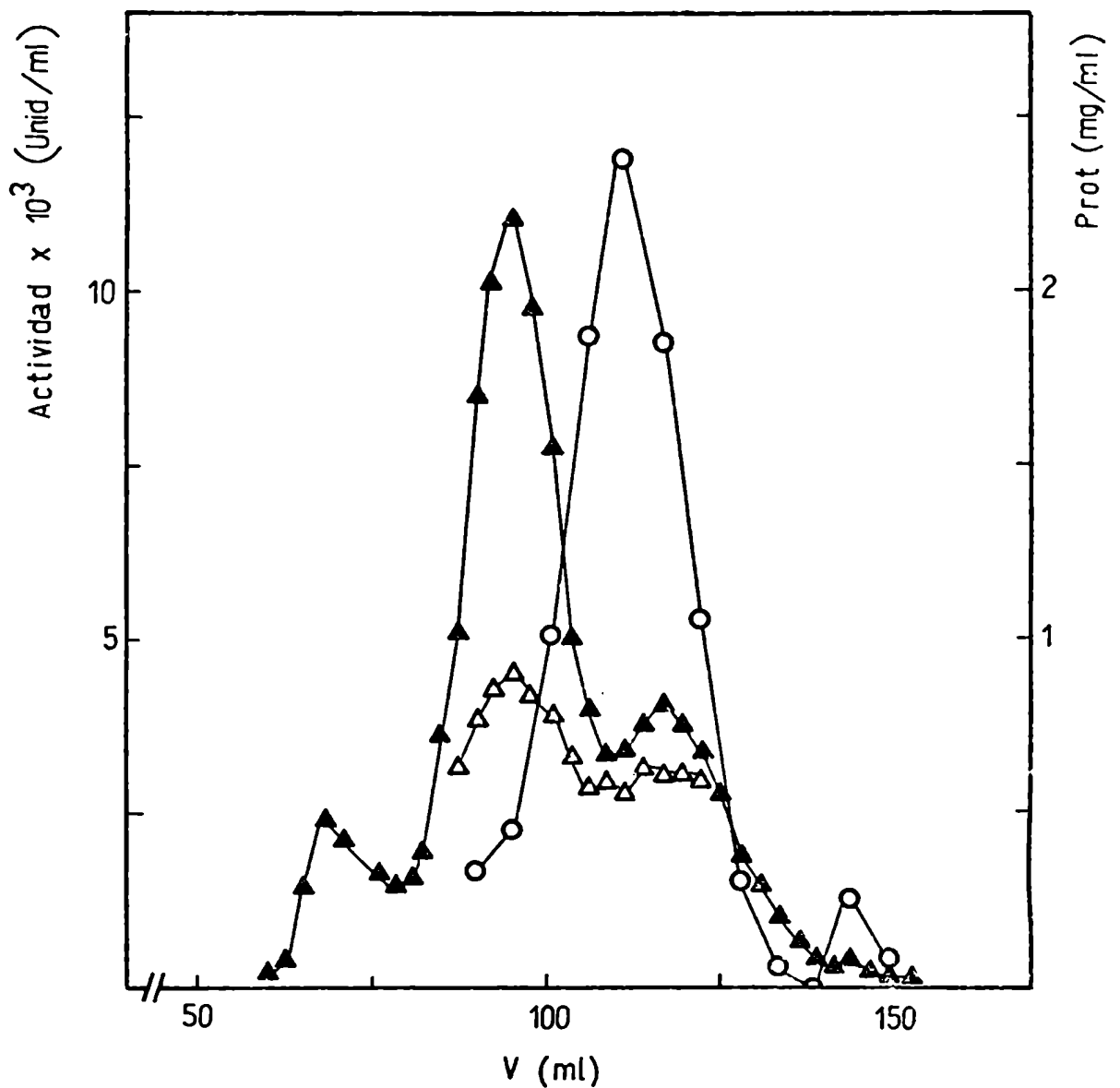
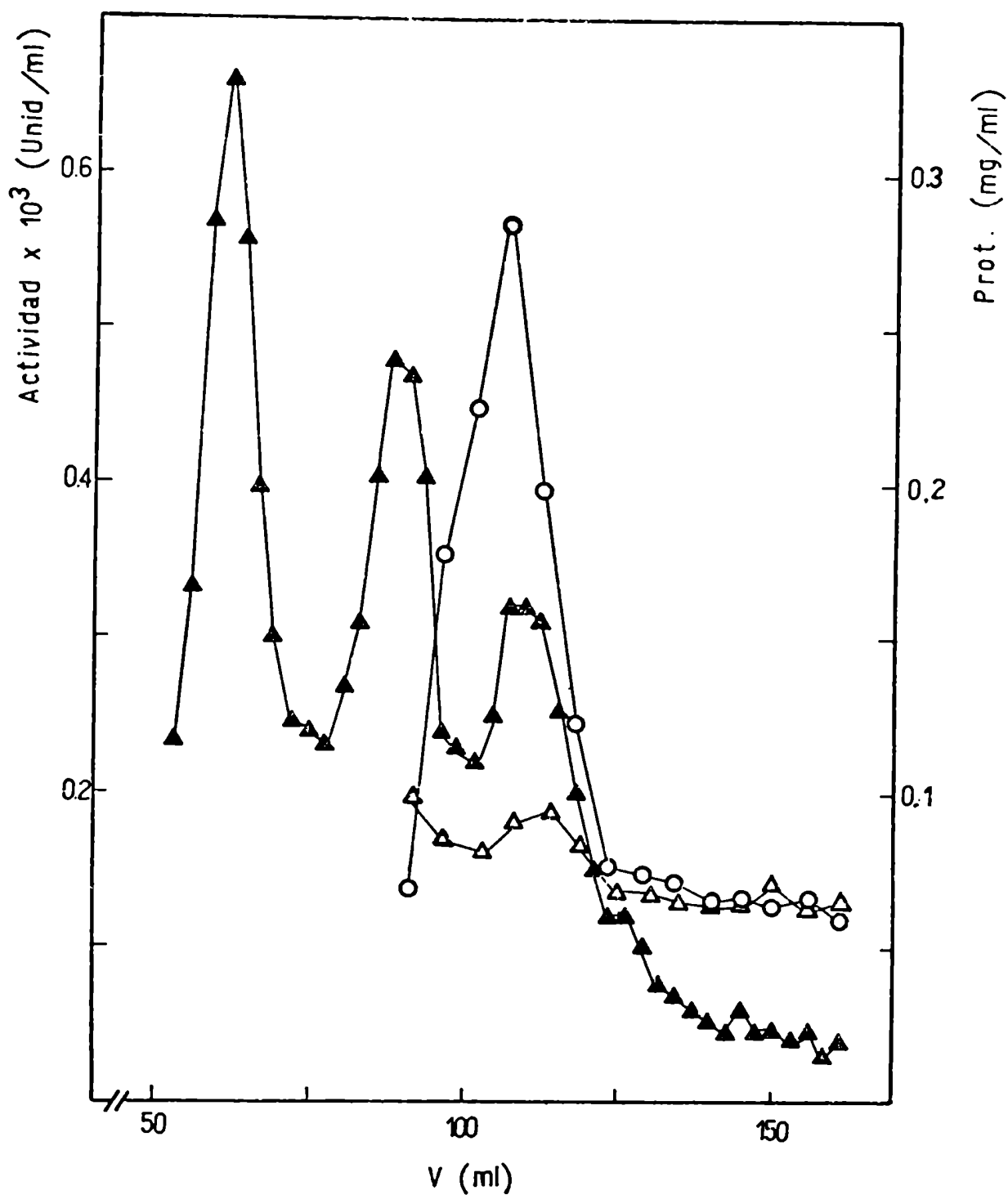


FIGURA III.8.: Curva de elución de rodenasa de GRHN. La fracción enzimática obtenida por fraccionamiento con sulfato de amonio se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 8 días, sembrándose luego 50 mg de proteína en la columna de Sephadex G-100. La elución se realizó con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,5; recogiendo fracciones de 2,5 ml. Las determinaciones de proteína y actividad se efectuaron de acuerdo con los procedimientos detallados en Materiales y Métodos. (○) Unidades/ml; (Δ) mg prot/ml por Lowry (1951); (▲) mg prot/ml por Warburg y Christian (1941)





**FIGURA III.9.:** Curva de elución de rodensina de GRH de un paciente con PCT.  
 La fracción enzimática obtenida por fraccionamiento con sulfato de amonio se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante dos días, sembrándose luego 10 mg de proteína en la columna de Sephadex G-100. La elución se realizó con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,5; recogiendo fracciones de 2,5 ml. Las determinaciones de actividad y proteínas se realizaron de acuerdo con los procedimientos detallados en Materiales y Métodos.  
 (○) Unidades/ml; (△) mg prot./ml por Lowry (1951); (▲) mg prot/ml por Warburg y Christian (1941).

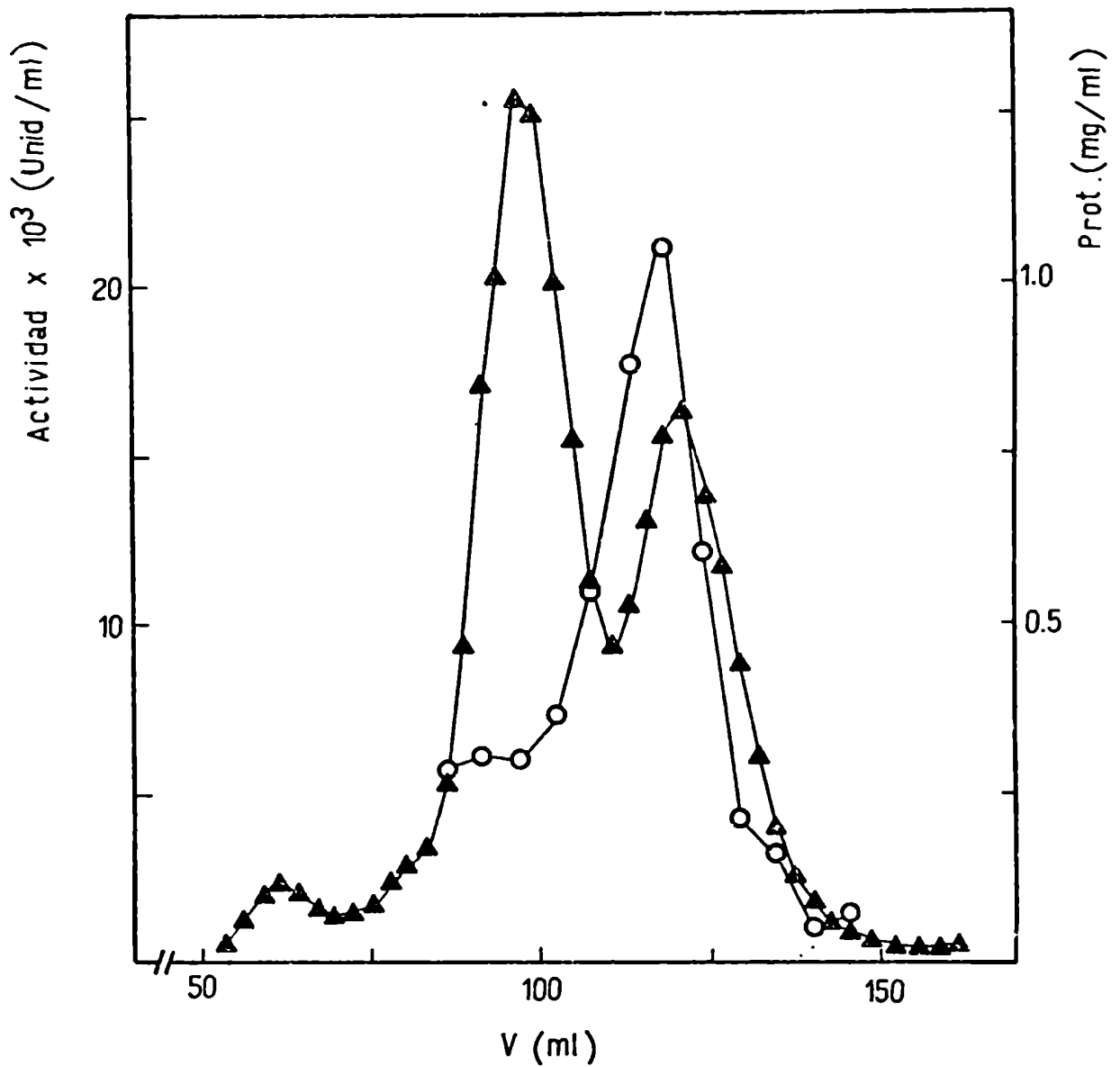


FIGURA III.10.: Curva de elución de rodenasa de GRH de un paciente con PAI  
 La fracción enzimática obtenida por fraccionamiento con sulfato de amonio se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 7 días, sembrándose luego 30 mg de proteína en la columna de Sephadex G-100. La elución se realizó con buffer Tris-ClH 0,05 M pH 7,5; recogiendo fracciones de 2,5 ml. Las determinaciones de proteína y actividad se efectuaron de acuerdo con los procedimientos detallados en Materiales y Métodos.  
 (o) Unidades/ml; (▲) mg prot/ml por Warburg y Christian (1941).

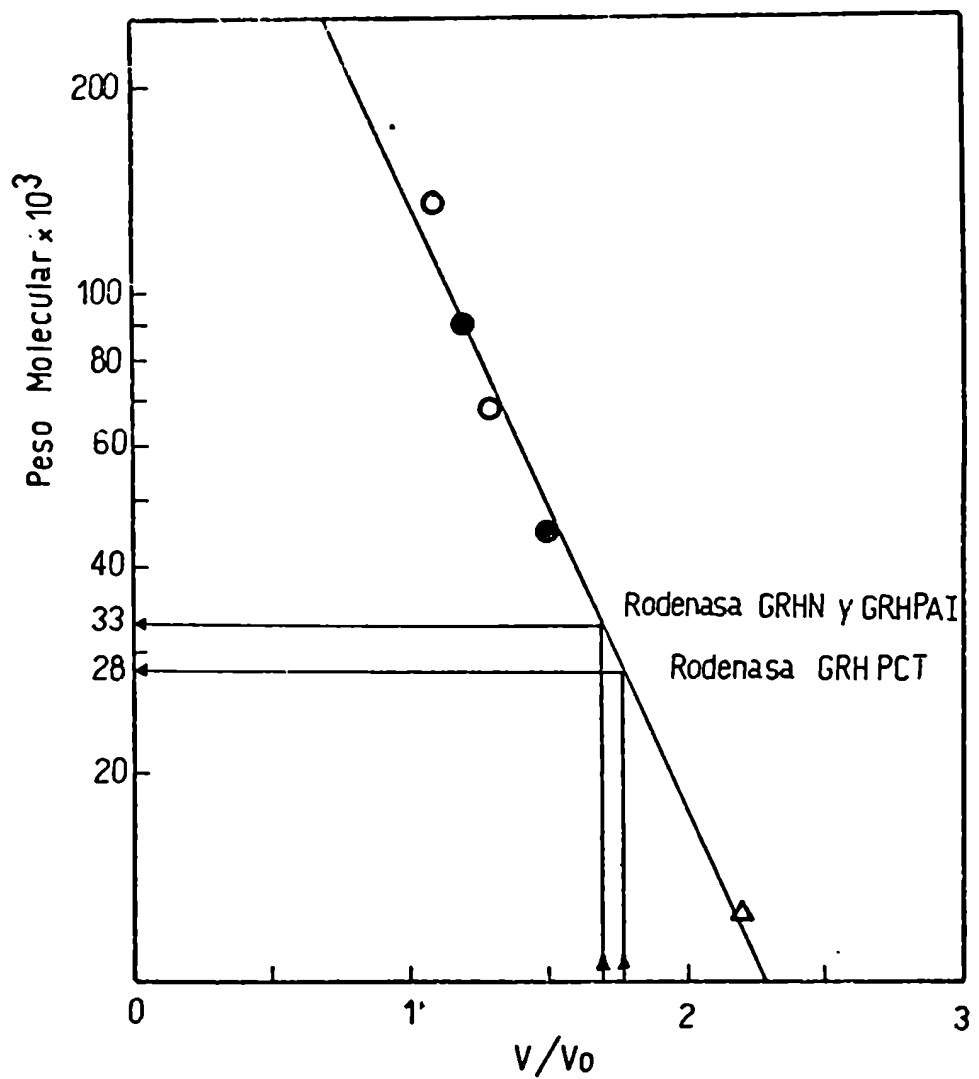


FIGURA III.11.: Curva de calibración para la determinación de peso molecular por una columna de Sephadex G-100. Se calibró la columna (50 cm de largo; 2,8 cm de diámetro) de Sephadex G-100 ( $v = 205$  ml) de acuerdo con lo detallado en Materiales y Métodos, empleando: blue-dextrano, seroalbúmina (○), ovoalbúmina (●) y citocromo (△). Se utilizó Tris-ClH 0,05 M pH 7,5 como buffer de elución y un flujo de 40 ml/h.

La purificación obtenida por Sephadex G-100 respecto del sembrado fue de aproximadamente 2 veces con un rendimiento del 20%.

De los valores obtenidos podemos concluir que no se encontraron diferencias significativas en el comportamiento cromatográfico de la enzima purificada de GRHN o porfíricos (Tabla III.4.). En todos los casos la enzima presentó un único pico de elución. El peso molecular hallado coincide con el reportado por diversos autores para la enzima obtenida de distintas fuentes.

TABLA III.4.: Pesos moleculares de rode-nasa de distintas fuentes enzimáticas

FUENTE ENZIMATICA	PESO MOLECULAR
GRHN	33.000
GRHPAI	33.000
GRHPCT	28.000

Cannella y col (1981) encontraron un peso molecular de 35.000 para la enzima nativa y desnaturalizada de hígado bovino y Vanderbergh y Berk (1980) reportaron el mismo peso molecular para la enzima purificada de *Acinetobacter calcoaceticus*.

### III.4. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES DE RODENASA PURIFICADA DE GRHN Y GRHPAI

#### III.4.1. pH óptimo de incubación

La enzima purificada se incubó en las condiciones standard en buffer Tris-ClH de pH variable entre 7,5 y 9,4.

La Figura III.12. muestra la curva obtenida para la rodénasa purificada a partir de GRHN y para la obtenida a partir de GR de un enfermo con PAI.

En ambos casos la actividad sufría fluctuaciones con los pequeños cambios obtenidos en el pH de incubación debido a la formación de una cupla entre Tris y  $\text{CN}^-$  que produce una variación del pH en aproximadamente sólo una unidad en el rango estudiado.

La enzima purificada de GRHN presentó un máximo incubada en el buffer standard (pH de incubación 9,3), mientras que para la enzima de GRHPAI el máximo estaba desplazado a un pH de incubación de 9,24.

En fuentes bacterianas el pH óptimo encontrado variaba entre 8 y 8,5 (Vanderbergh y Berk, 1981).

#### III.4.2. Estudios cinéticos de la enzima purificada de eritrocitos humanos

En investigaciones preliminares se comprobó que la actividad enzimática variaba en forma lineal con el tiempo de incubación. Por lo tanto, para estos estudios se consideró la formación de producto directamente proporcional a la velocidad de reacción.

Se determinó la velocidad de formación del producto sulfocianuro con la variación de la concentración de uno de los sustratos, a concentración constante y saturante del otro.

En las Figuras III.13. y III.14. se representan la variación de la velocidad en función de la concentración de tiosulfato y cianuro respectivamente, usando 0,02 ml de solución enzimática purificada de GRHN (actividad específica = 8.186 Unid/mg) en las condiciones standard. En ambos gráficos puede observarse, luego del punto de saturación, inhibición por sustrato, más pro-

nunciada y rápida para el cianuro.

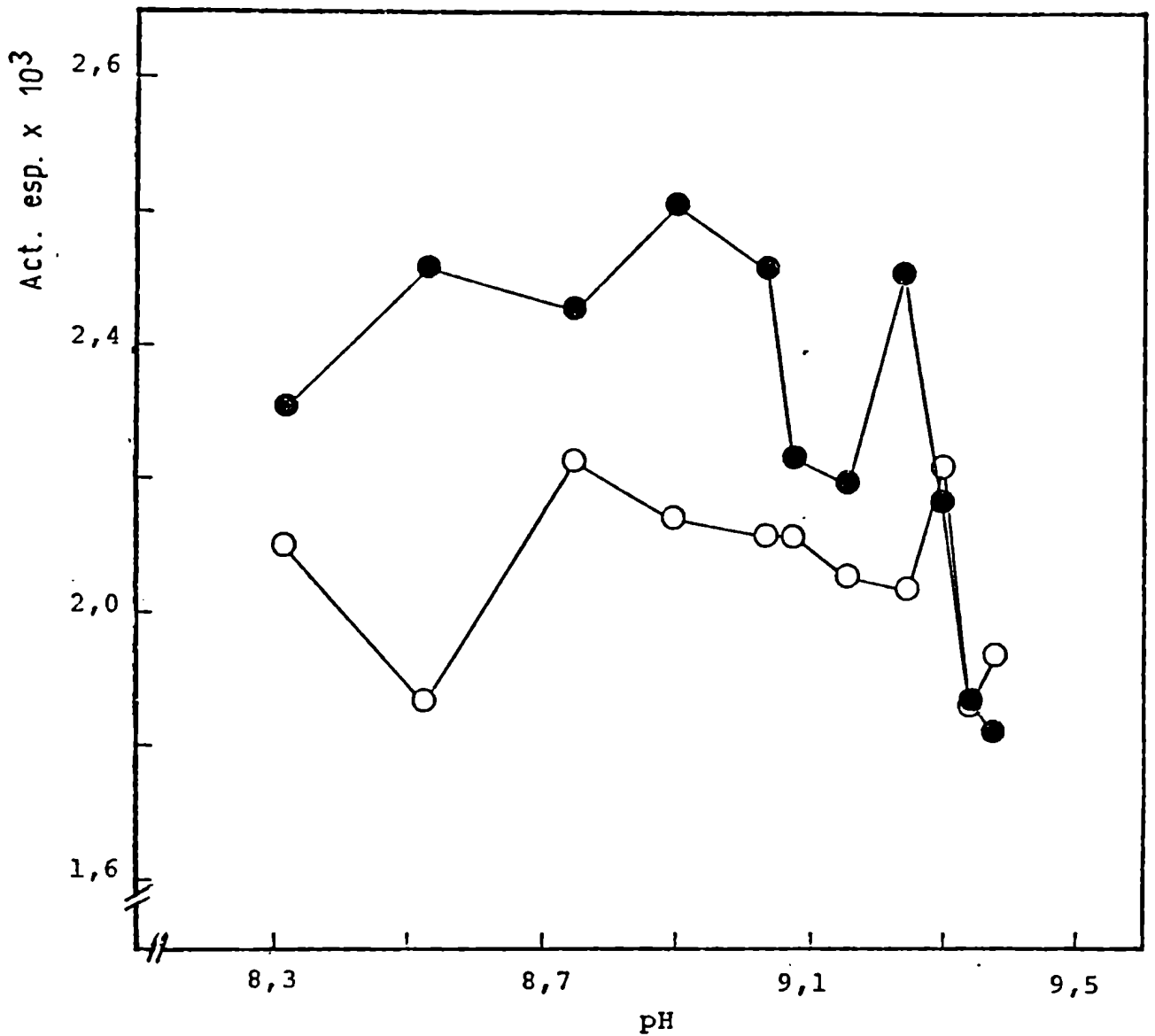


FIGURA III.12.: Curva de pH de rodenasa obtenida de GRH normales y de paciente con PAI. La determinación de actividad específica se realizó de acuerdo con los procedimientos detallados en Materiales y Métodos. La fracción purificada entre 45-65% de saturación con sulfato de amonio, a partir de GRHN (○) o de GRH de un paciente con PAI (●), se conservó a -20 °C durante 17 semanas en el caso de normales y 3 días en el caso de PAI; conteniendo dichas fracciones 16,72 y 16,97 mg de proteína/ml, respectivamente.

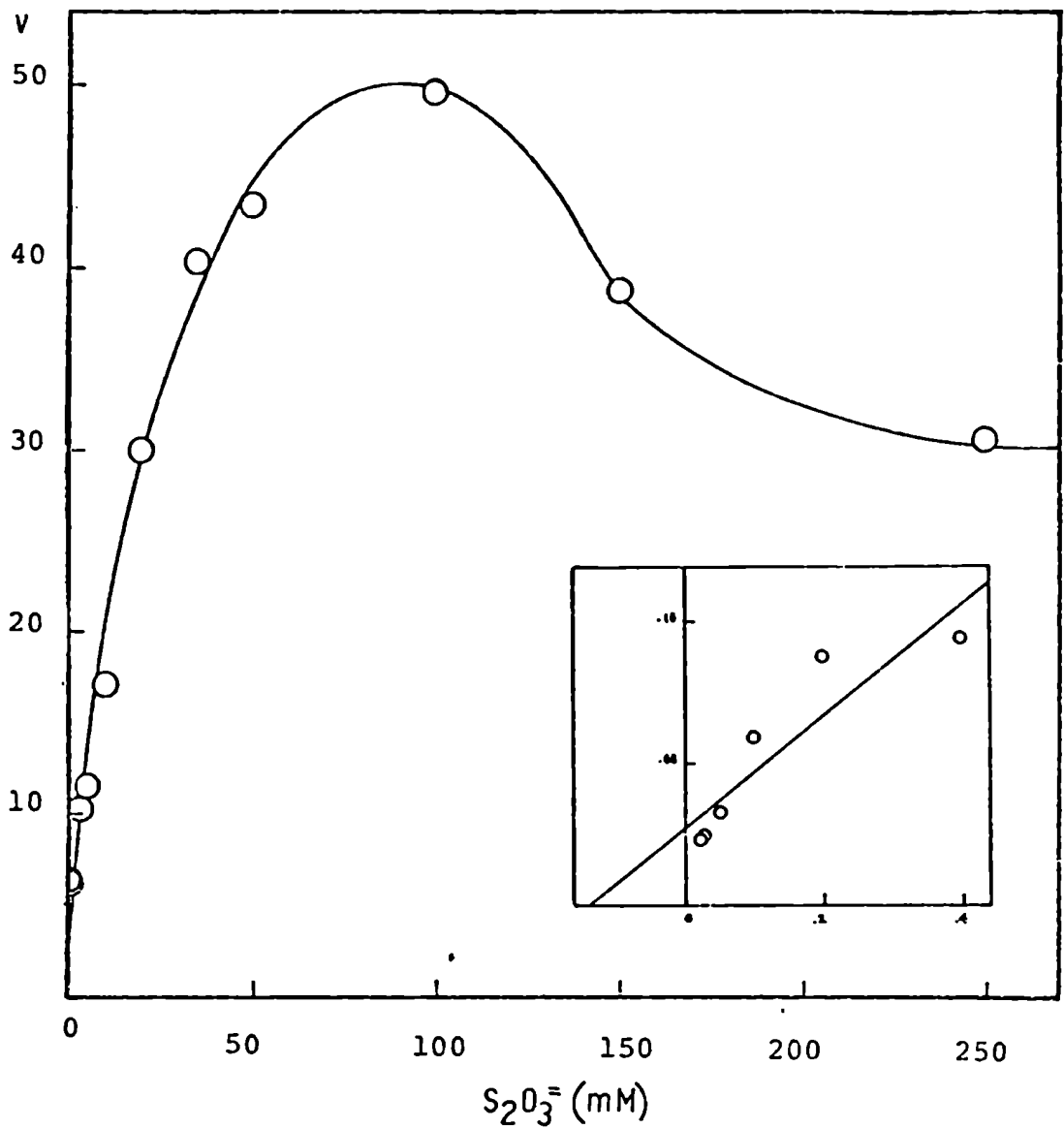
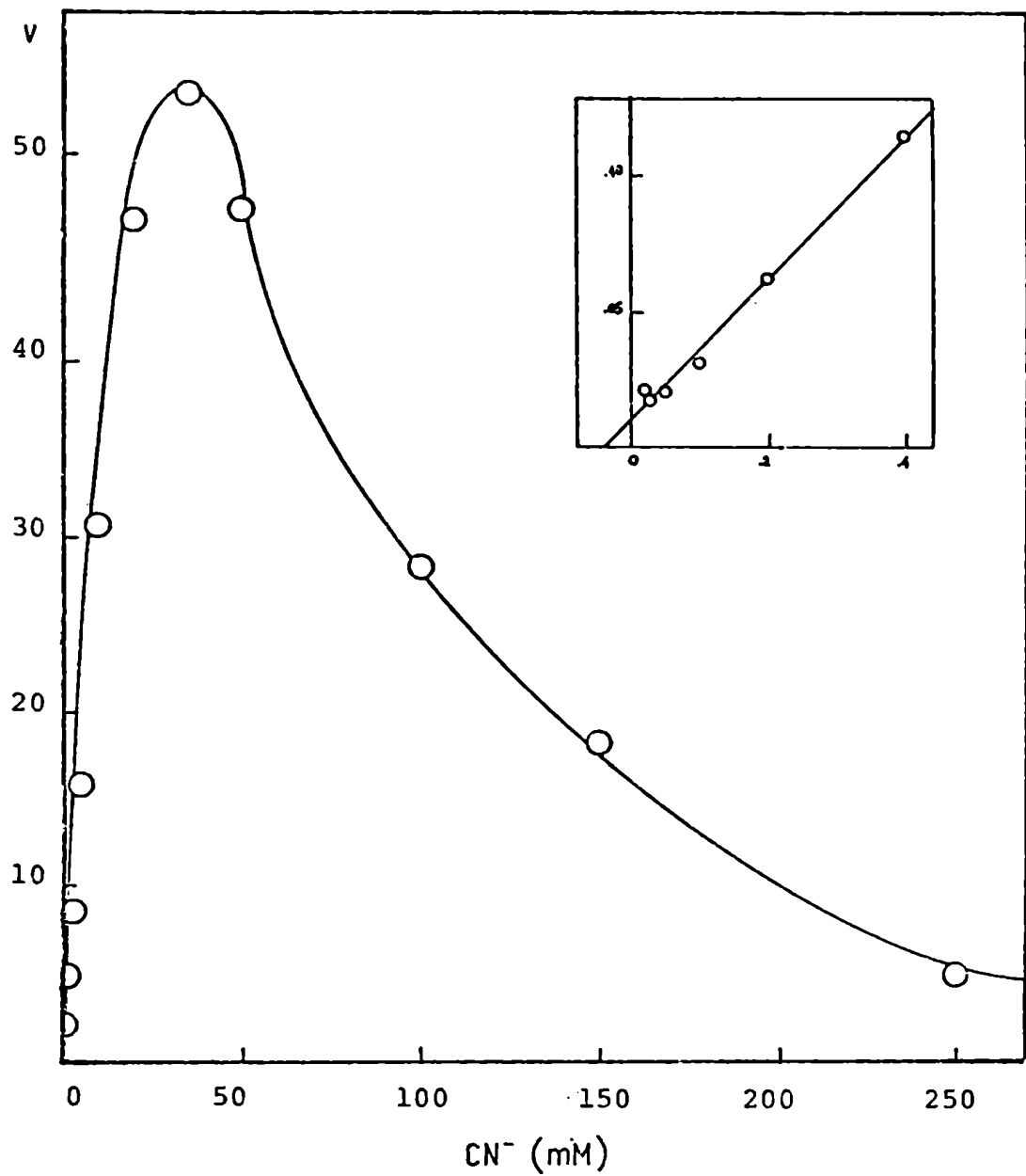


FIGURA III.13.: Variación de la actividad de rodenasa en GRHN en función de la concentración de tiosulfato. La determinación de actividad se realizó de acuerdo con el procedimiento detallado en Materiales y Métodos. Se utilizó la enzima proveniente del fraccionamiento con sulfato de amonio, mantenida a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 9 semanas. La concentración de cianuro se mantuvo constante e igual a 50 mM. Inset: Gráfico de Lineweaver-Burk para los puntos en los cuales no se comprobó inhibición por sustrato. (v): nmoles  $SCN^{-}$   $\times 10^3/30'$ ; ( $S_2O_3^{2-}$ ): mM



**FIGURA III.14.:** Variación de la actividad de rodenasa de GRHN en función de la concentración de cianuro. La determinación de actividad se realizó de acuerdo con el procedimiento detallado en Materiales y Métodos. Se utilizó la fracción purificada entre 45-65% de saturación con sulfato de amonio a partir de GRHN y conservada a -20 °C durante 9 semanas. La concentración de tiosulfato se mantuvo constante e igual a 50 mM.  
**Inset:** Gráfico de Lineweaver-Burk para los puntos en los cuales no se comprobó inhibición por sustrato.  
 (v): nmoles SCN⁻ x 10³/30'; (CN⁻): mM



Para los dos sustratos las curvas son de tipo michaeliano y representando  $1/v$  vs.  $1/(S)$  se obtienen rectas a partir de las cuales se determinó la velocidad máxima y el  $K_m$  (Figuras III.13. Inset y III.14. Inset).

Para el caso de la concentración de tiosulfato variable la  $V_{max}$  es de 36,5  $\mu$ moles  $SCN^-/30'$  y el  $K_m$  7,1 mM; con la concentración de cianuro variable los valores son 95,9  $\mu$ moles  $SCN^-/30'$  y 24,8 mM para  $V_{max}$  y  $K_m$  respectivamente (Tabla III.5.).

TABLA III.5.: Parámetros cinéticos de rodenasa purificada de GRHN y GRHPAI

PARAMETRO CINETICO	Vmax		Km	
	$\frac{\text{nmoles } SCN^- \text{ form. } \times 10^3}{\text{ml. sol. enz. } \times 30'}$		mM	
Sustrato variable	$S_2O_3^{=}$	$CN^-$	$S_2O_3^{=}$	$CN^-$
GRHN	36,5	95,9	7,1	24,8
GRHPAI	113,6	108,7	37,3	21,9

Los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  se determinaron por el método de ajuste de la recta por cuadrados mínimos.

Las Figuras III.15. y III.16. muestran las curvas de velocidad versus concentración de tiosulfato y cianuro respectivamente, usando 0,02 ml de solución enzimática purificada a partir de GRH del paciente con PAI (actividad específica 4.490 U/mg).

La curva de sustrato para cianuro variable muestra inhibición para concentraciones de sustrato mayores de 60 mM. En cambio la curva de actividad en función de la concentración de tiosulfato no muestra inhibición por sustrato; la actividad au-

menta a las concentraciones estudiadas, siendo 250 mM la máxima investigada.

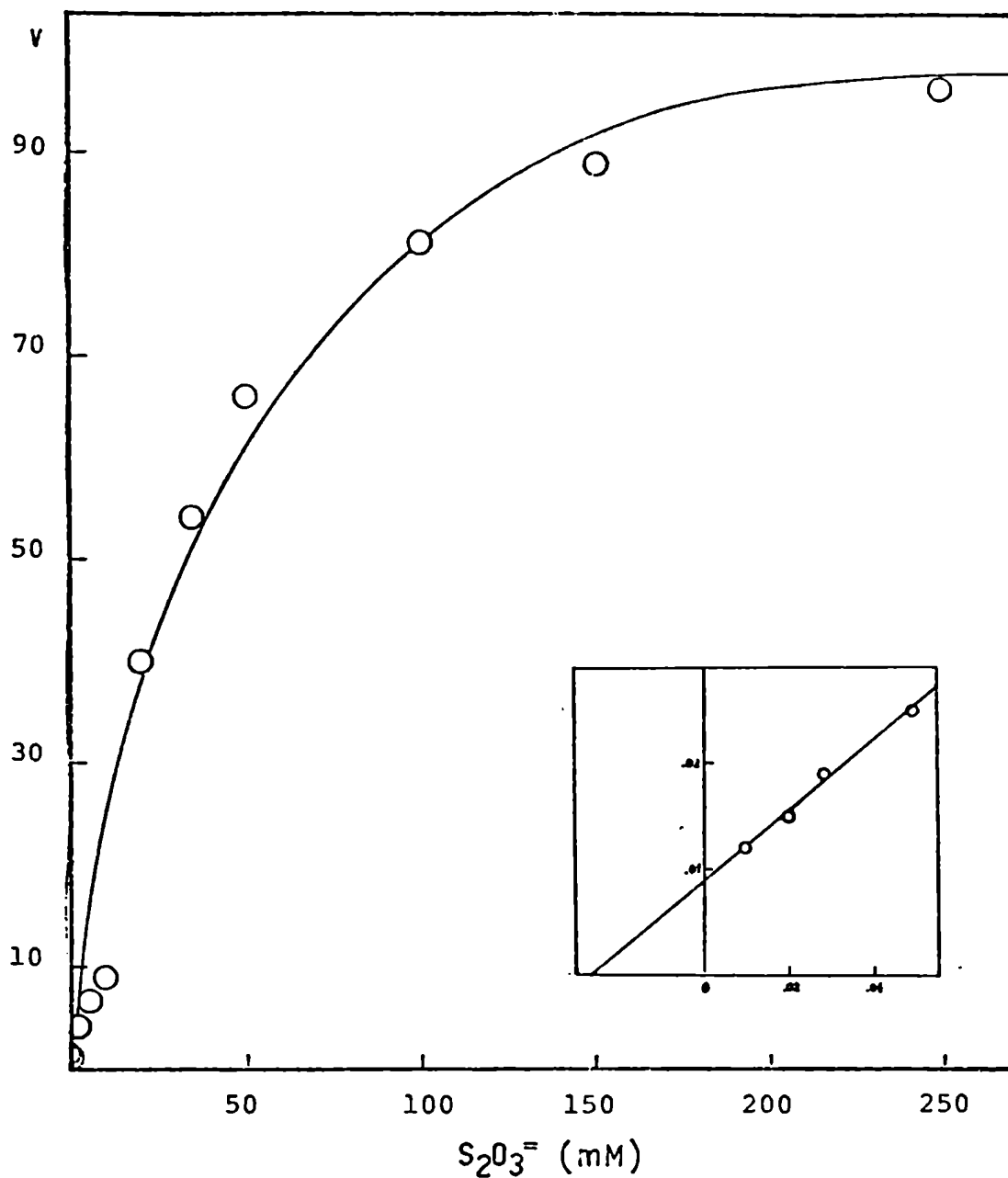


FIGURA III.15.: Variación de la actividad de rodenasa en GRH de paciente con PAI en función de la concentración de tiosulfato.

La determinación de actividad se realizó de acuerdo con el procedimiento detallado en Materiales y Métodos. Se utilizó la fracción purificada entre 45-65% de saturación con sulfato de amonio a partir de GRH de un paciente con PAI y conservada a -20 ° durante 1 semana. La concentración de cianuro se mantuvo constante e igual a 50 mM.

Inset: Gráfico de Lineweaver-Burk.  
(v): nmoles SCN<sup>-</sup> x 10<sup>3</sup>/30'; (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>):mM

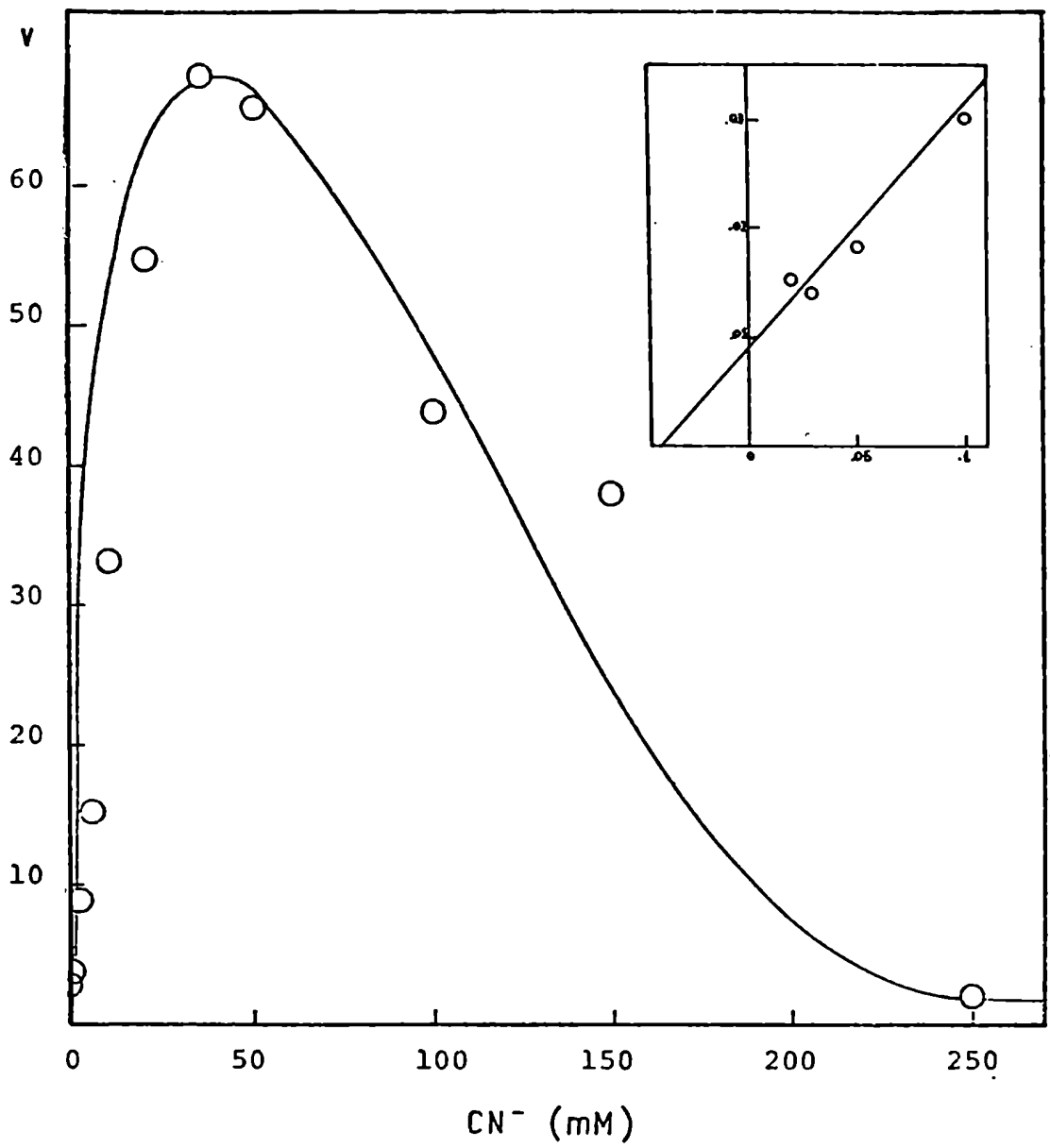


FIGURA III.16.: Variación de la actividad de rodenasa de GRH de un paciente con PAI en función de la concentración de cianuro. La determinación de actividad se realizó de acuerdo con el procedimiento detallado en Materiales y Métodos. Se utilizó la fracción purificada entre 45-65% de saturación con sulfato de amonio a partir de GRH de un paciente con PAI y conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante una semana. La concentración de tiosulfato se mantuvo constante e igual a 50 mM. Inset: Gráfico de Lineweaver-Burk para los puntos en los cuales no se comprobó inhibición por sustrato. (v):  $\text{nmols SCN}^{-} \times 10^3/30'$ ; (CN<sup>-</sup>): mM

En la representación gráfica de las inversas se obtuvieron rectas (Figuras III.15, Inset y III.16., Inset), determinándose  $V_{max}$  y  $K_m$  a partir de ellas.

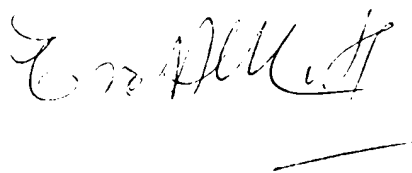
Para el caso de la concentración de tiosulfato variable se obtuvo una  $V_{max}$  de  $113,6 \mu\text{moles SCN}^-/30'$  y un  $K_m$  de  $37,3 \text{ mM}$ , con la concentración de  $\text{CN}^-$  variable los valores obtenidos son  $108,7 \mu\text{moles SCN}^-/30'$  y  $21,9 \text{ mM}$  para  $V_{max}$  y  $K_m$  respectivamente (Tabla III.5.). Nuevamente estos valores se obtuvieron ajustando las rectas por cuadrados mínimos.

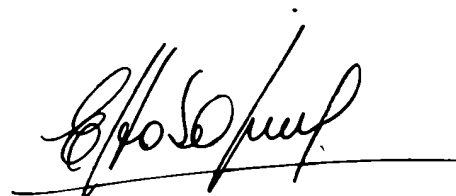
Los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  obtenidos resultaron coincidentes para el caso normal y para el de PAI cuando se variaba la concentración de cianuro, pero dichos valores eran muy distintos si el sustrato variable era el tiosulfato. Esto nos indica un comportamiento cinético diferente para la enzima purificada de GRHN y GRHPAI.

La marcada diferencia de los  $K_m$  respecto del tiosulfato, permitiría justificar los elevados niveles de ALA-S encontrados en los casos de porfiria. Si aceptamos que el tiosulfato es el sustrato donador de azufre, podemos establecer una analogía con el activador del ALA-S, trisulfocistina, también sustrato donador de azufre y suponer que en el caso de PAI, por exhibir la rodénasa una menor afinidad por el sustrato donador, éste no sería degradado en forma semejante al caso normal, y por lo tanto permanecería en concentraciones mayores, produciendo un aumento en la actividad del ALA-S; en esta situación la rodénasa no ejercería su función regulatoria sobre el metabolismo del hemo.

### III.5. CONCLUSIONES

- Se establecieron por primera vez las condiciones óptimas para la medición de rodenasa en eritrocitos humanos.
- Se determinaron los valores de actividad media para hombres (112) y mujeres (127) adultos normales.
- Se midió la rodenasa en pacientes de ambos sexos con distintas porfirias observándose que en los GR de individuos con PCT, PAI, PV e intoxicación por plomo, la actividad de la enzima se encontraba disminuída, mientras que en PPE el nivel era normal.
- Simultáneamente se comprobó que en los casos de PCT, PAI, PV e intoxicación por plomo, el ALA-S se encontraba aumentada; presentando un valor normal para PPE.
- Teniendo en cuenta estos datos, se postula un posible rol para la rodenasa presente en GR humanos.
- Se purificó la rodenasa de GRHN y de GRH de PCT y de PAI y se determinó el peso molecular en los tres casos.
- Se efectuó un estudio comparativo de los parámetros cinéticos de la enzima purificada de GRHN y GRHPAI. En base a las diferencias encontradas se plantea un posible mecanismo regulatorio de la rodenasa sobre la biosíntesis de compuestos tetrapirrólicos.





## REFERENCIAS

- Bustos, N.; Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 745.
- Cannella, C.; Costa, M.; Pensa, B.; Ricci, G.; Pecci, L. & Cavallini, D. (1981) Eur. J. Biochem. 119, 491.
- Vanderbergh, P.A. & Berk, R.S. (1980) Can. J. Microb. 26, 281.
- Wider de Xifra, E.A.; Sandy, J.D.; Davies, R. & Neuberger, A. (1976) Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 273, 79.