

## Tesis de Posgrado

# Estudio sobre la biosíntesis del hemo en tejidos hepáticos en condiciones normales y patológicas

Cánepa, Eduardo Tomás

1987

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:**

Cánepa, Eduardo Tomás. (1987). Estudio sobre la biosíntesis del hemo en tejidos hepáticos en condiciones normales y patológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2067\\_Canepa.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2067_Canepa.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Cánepa, Eduardo Tomás. "Estudio sobre la biosíntesis del hemo en tejidos hepáticos en condiciones normales y patológicas". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1987. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2067\\_Canepa.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2067_Canepa.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis

ESTUDIOS SOBRE LA BIOSINTESIS DEL HEMO EN TEJIDOS HEPATICOS  
EN CONDICIONES NORMALES Y PATOLOGICAS

Autor

Eduardo Tomás Cánepa

Director de Tesis

Dra. Elena B.C. Liambías

Lugar de Trabajo

Departamento de Química Biológica

- 2067 -  
EJ: 2

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

1987

**A mis padres**

**A mi hermano**

**A Santiago, mi esperanza**

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Elena B.C. Llambías, por su interés y dedicación en la dirección de esta Tesis.

Al Dr. Moisés Grinstein por sus sabios consejos y su activa participación en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Susana Passeron y al Dr. Miguel Galvagno por la colaboración brindada en una parte del trabajo.

A la Sra. Lilia Lezcano por la asistencia técnica proporcionada.

A todos mis compañeros del Departamento de Química Biológica por su constante estímulo y cooperación.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

## OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

- Purificación y caracterización de ferro- y cobaltoquelatasa de hígado de cerdo, actividades enzimáticas que incorporan  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  en mesoporfirina. Estudios tendientes a determinar si una misma proteína enzimática cataliza la inserción de ambos iones metálicos.
- Estudio de los mecanismos regulatorios implicados en la inducción de la biosíntesis del hemo, mediada por alilisopropilacetamida, plomo o fenobarbital, en suspensiones de hepatocitos de rata. Con especial énfasis en el papel desempeñado por el AMPc como uno de los factores involucrados en la regulación de dicho camino biosintético.
- Estudio de las modificaciones causadas por la diabetes experimental sobre el metabolismo del hemo en suspensiones de hepatocitos de ratas inyectadas con estreptozotocina, con el objeto de encontrar posibles factores que expliquen la alta frecuencia de incidencia conjunta entre los estados patológicos de porfiria y diabetes en humanos.
- Todos estos estudios son tendientes a colaborar en la determinación de las anomalías metabólicas que provocan las porfirias hepáticas humanas.

## TRABAJOS PUBLICADOS

Una parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis dieron origen a las siguientes publicaciones:

- "Properties of the cobaltochelataase and the ferrochelataase".  
Eduardo T. Cánepa y Elena B.C. Llambías.  
Enzyme 26 (1981), 288-295.
  
- "Effect of glucose on the induction of delta-aminolevulinic acid synthase and ferrochelataase in isolated hepatocytes by allylisopropylacetamide".  
Eduardo T. Cánepa, Elena B.C. Llambías y Moisés Grinstein.  
Biochimica Biophysica Acta 804 (1984), 8-15.
  
- "Effect of glucose on induction of delta-aminolevulinic acid synthase, ferrochelataase and cytochrome P-450 hemoproteins in isolated rat hepatocytes by phenobarbital and lead".  
Eduardo T. Cánepa, Elena B.C. Llambías y Moisés Grinstein.  
Biochimica Biophysica Acta 841 (1985), 186-194.
  
- "Studies on regulatory mechanisms of heme biosynthesis in hepatocytes from experimental diabetic rats".  
Eduardo T. Cánepa, Miguel A. Galvagno, Elena B.C. Llambías, Susana Passeron y Moisés Grinstein.  
Biochimica Biophysica Acta 847 (1985), 191-197.

## INDICE

<u>INTRODUCCION</u>	2
Estructura de porfirinas	4
CAPITULO 1: LA BIOSINTESIS DEL HEMO	6
Succinil CoA sintetasa	7
Biosíntesis de ALA	8
Biosíntesis de Porfobilinógeno	14
Biosíntesis de Uroporfirinógeno III	16
Conversión de Uroporfirinógeno III a Coproporfirinógeno III	19
Conversión de Coproporfirinógeno III a Protoporfirinógeno IX	20
Oxidación de Protoporfirinógeno IX	21
Formación de Hemo	23
BIODEGRADACION DEL HEMO	27
CAPITULO 2: CITOCROMO P-450	30
Estructura del citocromo P-450	30
Localización y especificidad de sustrato	31
Mecanismo de acción	31
Inducción del citocromo P-450	33
Inducción por drogas porfirinogénicas	36
CAPITULO 3: REGULACION E INDUCCION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO	38
Regulación de la actividad de ALA-S	38
-Inhibición de la actividad de ALA-S por hemo	39
-Represión de la síntesis de ALA-S	39
-Inhibición de la transferencia citosol-mitocondria	41
Pool de hemo regulador	42
-Biosíntesis de hemo y la inducción de citocromo P-450	42
-Biosíntesis de hemo y triptofano pirrolasa	43
AMPc en la regulación de la biosíntesis del hemo	44
Hormonas en la regulación de la biosíntesis del hemo	46
-Insulina y Glucagon	46
-Hormonas esteroides	47
Control por glucosa de la biosíntesis del hemo	48



Efecto de metales sobre la biosíntesis del hemo	51
-Plomo	51
-Hierro	52
-Cobalto	53
-Otros metales	53
CAPITULO 4: LAS PORFIRIAS	55
Porfirias agudas	57
-Porfiria aguda intermitente	57
-Coproporfiria hereditaria	57
-Porfiria variegata	58
Porfirias no agudas	58
-Porfiria cutánea tarda	58
-Protoporfiria eritropoyética	59
-Porfiria congénita	59
Porfiria tóxica y experimental	60
Diabetes y Porfiria	61
-Distintas clases de diabetes	62
-Asociación de diabetes con otras enfermedades	62
-Diabetes experimental	63
-Inducción de diabetes por estreptozotocina	63
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	65
MATERIALES	66
METODOS UTILIZADOS EN LA PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FERRO- Y COBALTOQUELATASA DE HIGADO DE CERDO	67
Preparación de mitocondrias de hígado de cerdo	67
Purificación de ferro- y cobaltoquelatasa	67
Otros métodos utilizados	68
-Sonicación	68
-Tratamiento con detergentes	68
-Tratamiento con gel de fosfato, calentamiento y acidificación	68
-Diálisis	69
-Ultrafiltración	69

Filtración por geles	69
-Proteínas marcadoras	69
-Determinación de proteínas marcadoras	70
Electroforesis	70
Propiedades	71
-Espectro de absorción	71
-Gráfico de Arrhenius	71
-Determinación de los valores de los parámetros cinéticos	71
-Preparación de las suspensiones de lípidos	71
Determinación de las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa	72
-Medición de mesoporfirina	73
Determinación de proteínas	73
MÉTODOS UTILIZADOS EN EXPERIMENTOS CON HEPATOCITOS DE RATAS	74
Animales	74
Obtención de hepatocitos aislados	74
-Soluciones utilizadas	74
-Obtención del hígado	75
-Preparación del hígado	75
-Determinación del número de células y de su viabilidad	76
Determinación de glucosa	77
Determinación de Lactato deshidrogenasa	77
Determinación de glutamato deshidrogenasa	77
Determinación de proteínas	78
Experimentos de inducción	78
Determinación del contenido de AMPc en hepatocitos	78
-Extracción del AMPc	78
-Medición del AMPc	79
-Líquido de centelleo	79
Incorporación de $^3\text{H}$ -leucina en proteínas de hepatocitos	79
-Incubación con $^3\text{H}$ -leucina	79
-Determinación de la radioactividad incorporada a proteínas	79
Fraccionamiento subcelular de los hepatocitos	80
Inducción de diabetes experimental en ratas	81
Determinación de diabetes experimental en ratas	81
Determinación de la actividad de succinil CoA sintetasa	81
Determinación de la actividad de ALA-D	81

Determinación de la actividad de ALA-S	82
Determinación de la actividad de ferroquelatasa	82
Determinación del contenido de citocromo P-450	83
<u>RESULTADOS</u>	84
<u>I-PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FERRO- Y COBALTOQUELATASA DE HIGADO DE CERDO</u>	85
<u>1ºPARTE: PURIFICACION DE FERRO- Y COBALTOQUELATASA</u>	86
Solubilización de la protefna mitocondrial	86
-Efecto de la sonicación	86
-Efecto del tratamiento con deoxicolato de sodio	86
-Efecto del tratamiento con Tween 20	87
-Efecto del tratamiento con Lubrol PX	87
-Efecto del tratamiento con Lubrol WX	91
-Efecto del tratamiento con Tritón X-100	91
-Efecto del tratamiento con agentes caotrópicos	93
Purificación de la protefna mitocondrial solubilizada	93
-Tratamiento con gel de fosfato de calcio	94
-Precipitación diferencial por calentamiento a distintas temperaturas	94
-Precipitación por cambio de pH	94
-Diálisis	94
-Ultrafiltración	96
-Fraccionamiento salino	96
-Filtración molecular por Sephadex G-25	96
-Filtración molecular por Sephadex G-200	99
-Filtración molecular por Sephacryl S-300	99
Esquema de la purificación de ferro- y cobaltoquelatasa	102
-Pureza y estabilidad	102
<u>2ºPARTE: CARACTERIZACION DE FERRO- Y COBALTOQUELATASA</u>	104
Peso molecular	104
Espectro de absorción	104
Curva de tiempo de la reacción	104

Efecto de la cantidad de proteínas	108
Efecto del pH sobre la actividad enzimática	108
Efecto de la temperatura y energía de activación	108
Estudios cinéticos de las reacciones	108
Efecto de iones metálicos	108
Efecto de reactivos de grupos sulfhidrúlicos	115
Protección por sustratos de la inactivación por un reactivo sulfhidrúlico	115
Efecto protector de los sustratos contra la inactivación por calor	118
Efecto de ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol	118

## II-MECANISMOS DE REGULACION EN LA BIOSINTESIS DEL HEMO EN SUS- PENSIONES DE HEPATOCITOS DE RATA 120

Viabilidad e integridad metabólica de los hepatocitos	121
-Observación microscópica	121
-Rendimiento y viabilidad celular	121
-Integridad metabólica celular	121
-Efecto sobre la viabilidad de diversas sustancias agregadas al medio de incubación	124
Actividad específica de enzimas de la biosíntesis del hemo y contenido de citocromo P-450 en hepatocitos de ratas normales	124
Experimentos de inducción con drogas porfirinogénicas	125
-Efecto de alilisopropilacetamida	125
-Efecto del fenobarbital	127
-Efecto del plomo	127
-Efecto de la actinomicina D sobre la inducción de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450	130
-Efecto de la cicloheximida sobre la inducción de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450	130
Efecto glucosa sobre las inducciones de ALA-S, Ferroquelatasa y Citocromo P-450	132
-Efecto de la glucosa	132
-Efecto de fructosa, galactosa, manosa, glicerol, piruvato, lactato y 2-deoxiglucosa	135

Efecto del AMPc sobre las inducciones de ALA-S, Ferroquelatasa y Citocromo P-450	138
-Efecto del dibutiril AMPc	138
-Efecto de actinomicina D y cicloheximida sobre la potenciación causada por el dibutiril AMPc	141
-Especificidad del requerimiento de AMPc	141
-Supresión del efecto glucosa	141
Desarrollo del estado diabético en ratas y consecuencias sobre el metabolismo del hemo en hepatocitos	146
-Evaluación del desarrollo de la diabetes experimental en los animales	146
-Actividades de ALA-S, ferroquelatasa y contenido de citocromo P-450 y AMPc en hepatocitos de ratas normales y diabéticas	147
Inducción de la biosíntesis del hemo en hepatocitos de ratas diabéticas	148
-Inducción de ALA-S y ferroquelatasa en hepatocitos de ratas diabéticas	148
-Inducción del contenido de citocromo P-450 en hepatocitos de ratas diabéticas	148
-Efecto de la glucosa sobre la inducción de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 en hepatocitos de ratas diabéticas	150
Actividades de ALA-S y ferroquelatasa y contenido de citocromo P-450. Efecto de fenobarbital, glucosa y dibutiril AMPc. Comparación entre hepatocitos de ratas normales y diabéticas	153
Efecto de agentes moduladores de niveles intracelulares de AMPc en hepatocitos de ratas normales y diabéticas	153
-Efecto de inhibidores de fosfodiesterasa	155
-Efecto de un inhibidor de adenilato ciclasa y un activador de fosfodiesterasa	158
Efecto de la adenosina sobre las inducciones de ALA-S, Ferroquelatasa y citocromo P-450 mediadas por fenobarbital y dibutiril AMPc en hepatocitos de ratas normales y diabéticas	158
Contenido de AMPc en hepatocitos de ratas normales y diabéticas. Efecto de fenobarbital y glucosa	161
Incorporación de <sup>3</sup> H-leucina en las proteínas de hepatocitos de ratas normales y diabéticas	161

Curvas de tiempo de los efectos del fenobarbital sobre las actividades de ALA-S y Ferroquelatasa, los contenidos de Citocromo P-450 y AMPc y la síntesis de proteínas en hepatocitos de ratas normales y diabéticas	164
Distribución subcelular de ALA-S en hepatocitos de ratas normales y diabéticas	164
<u>DISCUSION</u>	168
PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FERRO- Y COBALTOQUELATASA DE HIGADO DE CERDO	169
MECANISMOS DE REGULACION EN LA BIOSINTESIS DEL HEMO EN SUSPENSIONES DE HEPATOCITOS DE RATA	180
Conclusiones	198
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	202

## ABREVIATURAS

AIA: alilisopropilacetamida  
ALA: ácido 5-aminolevulínico  
ALA-D: ácido 5-aminolevulínico deshidrasa  
ALA-S: ácido 5-aminolevulínico sintetasa  
cDNA: DNA complementario  
CoA: Coenzima A  
DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,6-dihidrocolidina  
GSF: griseofulvina  
HCB: hexaclorobenceno  
LDH: láctico deshidrogenasa  
MIX: 3-isobutil-1-metilxantina  
mRNA: RNA mensajero  
PAI: porfiria aguda intermitente  
PBG: porfobilinógeno  
PBGasa: porfobilinógeno deaminasa  
PCMB: p-cloro mercuriobenzoato  
PCT: porfiria cutanea tarda  
SDS: lauril sulfato de sodio  
STZ: estreptozotocina  
TCA: ácido tricloroacético  
TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina  
URO-D: uroporfirinógeno decarboxilasa  
URO-III: uroporfirinógeno III  
V<sub>máx</sub>: velocidad máxima

## INTROUCCION



## INTRODUCCION

El hemo es una estructura porfirínica planar la cual posee en su centro un átomo de metal. El catión metálico quelado es el hierro (II) y la porfirina, la protoporfirina IX.

Virtualmente todas las células de los animales superiores son capaces de sintetizar hemo, ya sea en forma continua a través de su vida o bien en alguna etapa de su desarrollo. El hemo sintetizado es utilizado como grupo prostético por una gran variedad de proteínas (hemoproteínas) relacionadas con diversas funciones. Entre éstas se cuentan: a) el transporte y transferencia de oxígeno en y entre las células (hemoglobina, mioglobina); b) la protección de la célula contra tóxicos de características oxidantes (catalasa, peroxidasa); c) la transferencia de electrones acoplada a la síntesis de ATP (citocromos mitocondriales); d) el metabolismo de ácidos grasos, esteroides y xenobióticos (citocromos microsomales).

La capacidad de las hemoproteínas de llevar a cabo estas funciones es una propiedad del ión metálico central, que es capaz de sufrir cambios reversibles en su estado de oxidación. El anillo porfirínico aumenta la capacidad catalítica del metal y esta actividad es posteriormente incrementada por la unión de la metaloporfirina con su apoproteína, que le confiere, además, su actividad biológica específica.

El significado biológico del hemo y otras metaloporfirinas se esquematiza en la figura 1 y está relacionado principalmente con la utilización y producción de energía. Las clorofilas, complejos de Mg-porfirina, utilizan la energía solar en la producción de hidratos de carbono a partir de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , mientras que el hemo, una Fe-porfirina, interviene en los procesos que utilizan esos hidratos de carbono para la producción de energía en los sistemas biológicos.

La mayor parte del hemo es sintetizado, en animales superiores, en los eritrocitos inmaduros, los reticulocitos, y en el hígado. Tanto en la médula ósea como en el hígado la velocidad de síntesis del hemo está precisamente regulada y puede ser elevada considerablemente debido a una mayor

demanda de eritrocitos circulantes o en respuesta a inductores de citocromo P-450, respectivamente.

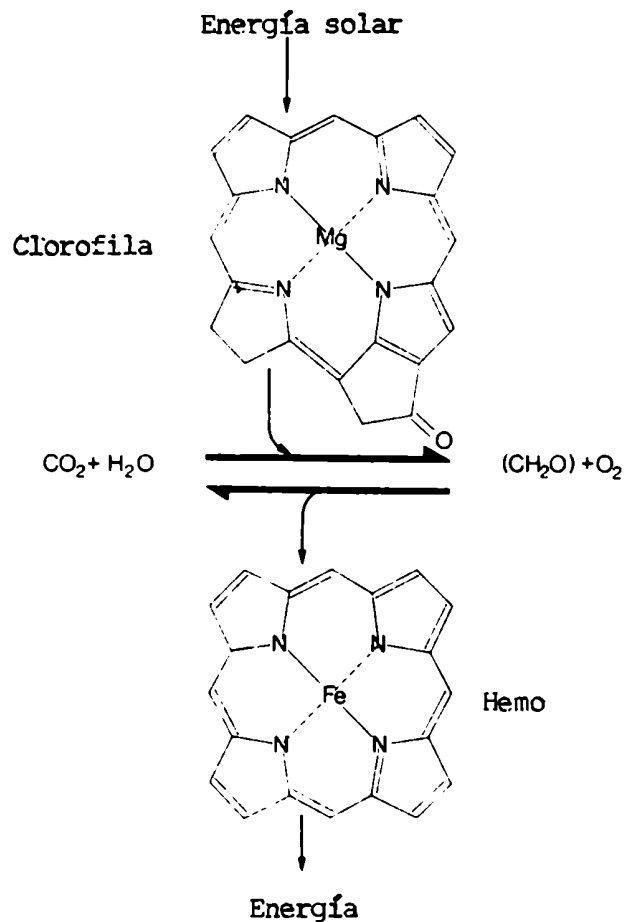


Figura 1: El significado biológico de las porfirinas

Cualquier defecto o anomalía, ya sea genética o adquirida, que altere de algún modo el sistema de regulación de la formación de hemo, provocará la acumulación excesiva de ciertos precursores e intermediarios de este camino metabólico, conduciendo a un estado patológico conocido como porfiria.

Por ello, el conocimiento completo de todos los factores involucrados en el control y regulación de la biosíntesis del hemo es de fundamental importancia para la formulación de una prevención y terapéutica aplicable a dichas enfermedades.

## Estructura de porfirinas

El núcleo básico de las porfirinas consiste en 4 anillos pirrólicos unidos por cuatro puentes metileno que forman un macrociclo. Éste es una estructura rígida planar sobre la cual puede haber 8 cadenas laterales en las posiciones 1 a 8. Los cuatro pirroles son designados A, B, C y D y los puentes metilenos alfa, beta, gama y delta. El tipo y ubicación de las cadenas laterales da origen a un gran número de isómeros y determinan, además, las propiedades físicas y químicas de la porfirina en cuestión (figura 2).

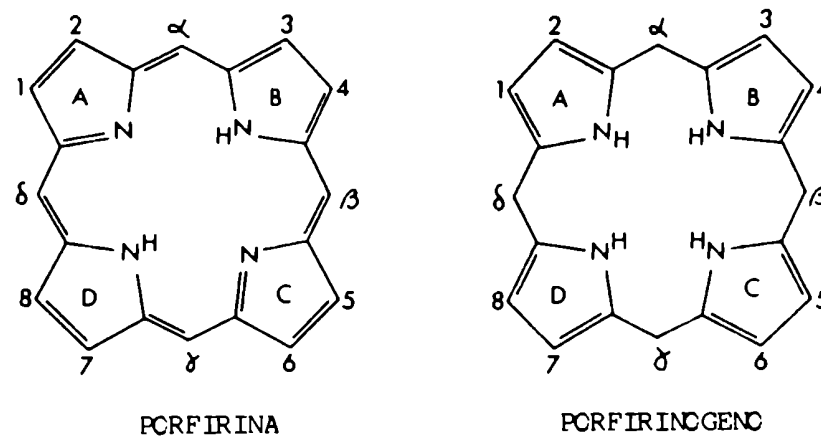


Figura 2: Las estructuras básicas de porfirinas y porfirinógenos

La clasificación de los isómeros se hace a partir de 4 tipos básicos denominados I, II, III y IV (figura 3).

Es importante señalar que sólo isómeros de las series I y III han sido aislados en la naturaleza. Sin embargo en todas las hemoproteínas identificadas, la porfirina, protoporfirina IX, pertenece a la serie isomérica III (1). Es decir que, como se verá más adelante, uroporfirina y coproporfirina del tipo I pueden ser biosintetizadas pero no ser metabolizadas a protoporfirina y hemo.

Numerosos estudios (2, 3) han establecido que los intermediarios

biológicos normales no son estos compuesto altamente conjugados, sino que el camino biosintético procede a través de los porfirinógenos, porfirinas reducidas conteniendo 6 átomos de hidrógeno adicionales.

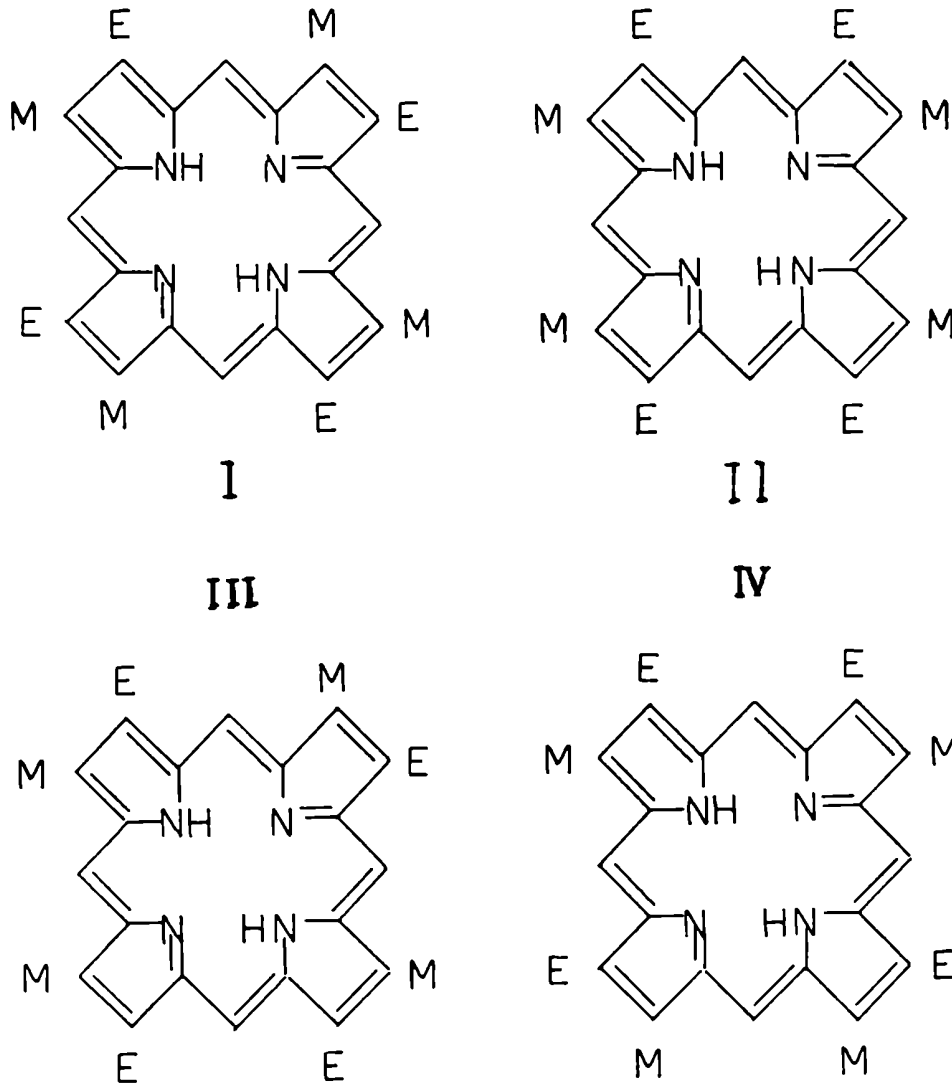


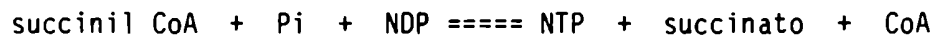
Figura 3: Las cuatro series isoméricas de porfirinas

La secuencia biosintética inicial para la síntesis de hemo, clorofilas y corrinas es la misma y cada una utiliza estos porfirinógenos como compuestos intermediarios del producto final.



## Succinil CoA sintetasa

La enzima succinil CoA sintetasa [succinato: CoA ligasa (ADP) EC 6.2.1.5 y (GDP) EC 6.2.1.4] cataliza la reacción:



Esta reacción es reversible y puede ser considerada como la interconversión de dos clases de uniones de alta energía: tioréster y fosfato.

Un importante papel fisiológico desempeñado por esta enzima es su participación en el ciclo de Krebs a través de la fosforilación de los nucleósidos difosfatos. Por otro lado, en la dirección inversa, la reacción puede ser vista como la síntesis de succinil CoA, precursor anabólico de productos tales como el hemo y la cistationina (4, 5).

Labbe y col. (6) encontraron un incremento en los niveles de succinil CoA sintetasa en hígado de ratones inyectados con drogas capaces de causar porfiria experimental. Estos resultados fueron interpretados como indicadores de que esta enzima, a través de un pool de succinil CoA, estaría directamente involucrada en el control del camino biosintético del hemo en células hepáticas de ratones.

La enzima succinil CoA sintetasa ha sido purificada y caracterizada de numerosas fuentes (7, 8). Sin embargo el interés de los investigadores ha sido enfocado hacia las enzimas provenientes de *Escherichia coli* (9) y de corazón de cerdo (10).

La especificidad en cuanto a los nucleótidos requeridos parece ser distinta para las plantas y bacterias, las cuales emplearían ATP-ADP, y para animales, los que utilizarían GTP-GDP. Sin embargo, Allen y Ottaway (11) recientemente han demostrado un requerimiento absoluto de ATP para la succinil CoA sintetasa de mitocondrias de músculo de paloma.

La succinil CoA sintetasa de *E. coli* tiene un peso molecular de 136.000 y comprende 2 tipos de subunidades ensambladas como un  $(\alpha\text{-}\beta)_2$  tetrámero. La subunidad alfa (29.500) une el ATP y cataliza la transferencia del fósforo a uno de sus residuos histidina, mientras que la subunidad beta (38.500) contiene el sitio de unión para el succinato y la coenzima A. El sitio activo completo está probablemente localizado en la región de contacto entre alfa-beta (12). La enzima exhibe "sinergismo de sustrato", por lo cual es más activa para la catálisis de sus reacciones parciales sólo cuando todos los sitios de unión de sustratos están ocupados, y "cooperatividad catalítica" entre sitios activos alternados, por lo

cual la interacción de los sustratos, particularmente el ATP, en uno de los sitios es necesaria para promover la catálisis en el otro (13). Recientemente, Nishimura y Mitchel (14), sugirieron un mecanismo similar para la enzima proveniente de corazón de cerdo.

La estructura primaria de la succinil CoA sintetasa de E.coli ha sido estudiada por Buck y col.(15) a partir de la secuencia nucleotídica de 2451 pares de bases del segmento de DNA conteniendo los genes de suc C (subunidad beta) de 1161 pares de bases y el gen suc D (subunidad alfa) de 864 pares de bases. Estos genes estarían localizados al final de un "cluster" de 9 genes que codificarían para las enzimas del ciclo de Krebs. La expresión de succinil CoA sintetasa estaría coordinadamente regulada con la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (16).

#### Biosíntesis de ALA

La primera etapa de la biosíntesis del hemo es la condensación de succinato activado como succinil CoA y glicina para formar ALA. La enzima que cataliza esta reacción es la ácido 5-aminolevulínico sintetasa [succinil CoA: glicina C-succinil transferasa (EC 2.3.1.37)]. Su presencia ha sido demostrada en un gran número de células, incluyendo bacterias fotosintéticas (17) y no fotosintéticas (18) y en numerosos tejidos de aves (19) y mamíferos (20, 21).

Neuberger y Shemin (22) demostraron el requerimiento absoluto de fosfato de piridoxal para la actividad catalítica de la enzima, lo cual había sido sugerido anteriormente a partir de observaciones realizadas en humanos y animales con deficiencias nutricionales, especialmente en vitamina B<sub>6</sub> y ácido pantoténico, y que presentaban anomalías en la síntesis de hemo (23).

El mecanismo de acción propuesto para la enzima ácido 5-aminolevulínico sintetasa (ALA-S) (24, 25) consiste, inicialmente, en la unión del fosfato de piridoxal a la superficie de la enzima a través de un grupo SH del sitio activo y la formación de una base de Schiff con la glicina. Posteriormente, se produce la condensación del succinato activado como succinil CoA para dar el ácido alfa-amino-beta-cetoadípico, el cual es descarboxilado a ácido 5-aminolevulínico (26).

En 1963, Granick y Urata (27) encontraron que la administración de

3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) a embriones de pollo producía un aumento de 40 veces de la actividad de ALA-S. Posteriormente, Granick (28) describió una gran cantidad de sustancias, de variadas estructuras químicas, capaces de provocar un incremento en la actividad de esta enzima. Por otra parte, Tschudy y col.(29), trabajando con pacientes que presentaban un tipo de porfiria hepática conocida como porfiria aguda intermitente, encontraron un marcado incremento en la actividad de la enzima que catalizaba la formación de ALA.

Es así que a partir de estos y otros estudios quedó demostrado, sin lugar a dudas, que la ALA-S es la enzima limitante de la velocidad y el punto sobre el cual se ejerce el control metabólico primario sobre la biosíntesis del hemo.

Trabajos de Granick (28) y Marver (30) confirmaron que ALA-S es una enzima inducible y que, al menos en el hígado, está sujeta a represión e inhibición por hemo. La inducción de ALA-S implica una síntesis de novo de la molécula proteica (31).

En la célula eucariota intacta, el ALA sólo puede ser formado dentro de la mitocondria, dado que, esta organela, es la única capaz de generar succinil CoA. La matriz y crestas mitocondriales fueron señaladas como conteniendo la mayor parte de ALA-S intracelular (32). Recientemente, Scott y col. (33), trabajando en hígado de rata, localizaron exclusivamente en la matriz mitocondrial a esta enzima, dado que respondía a la extracción con Lubrol y digitonina y posterior sonicación, exactamente igual que la isocitrato deshidrogenasa, enzima marcadora de esta fracción mitocondrial.

En 1969, Hayashi y col.(34) observaron que en ratas tratadas con alilisopropilacetamida (AIA), un inductor de porfiria experimental, no sólo se producía un incremento en la cantidad de ALA-S mitocondrial sino, también, una considerable cantidad de dicha enzima se acumulaba en la fracción citosólica hepática. Esta acumulación de ALA-S en la fracción citosólica del hígado fue luego observada en ratones (35) y pollos (36) luego de la administración de AIA o DDC. El incremento de ALA-S, tanto en la fracción mitocondrial como citosólica, luego de la administración de una dosis de AIA, podía ser prevenido con una inyección de cicloheximida pero no por una de cloranfenicol (28, 34). Asimismo, esta inducción podía ser suprimida con mitomicina C, un inhibidor de la síntesis de DNA nuclear, pero que no afecta al mitocondrial (34).

El conjunto de datos obtenidos al respecto sugirió que, al igual



que la mayoría de las proteínas mitocondriales, la enzima ALA-S se sintetizaría en poliribosomas citoplasmáticos. Se sostuvo entonces que, la síntesis de proteína enzimática ocurría en el citoplasma y se realizaba en poliribosomas unidos a membranas. Avalaba esta última afirmación la hipótesis propuesta que el retículo endoplásmico jugaba un rol importante en la biogénesis mitocondrial (37). Sin embargo, Whiting en 1976 (38), observó que cuando el sobrenadante postmitocondrial de hígado de embriones de pollo tratados con AIA era separado en poliribosomas libres y unidos a membrana, la síntesis de ALA-S, estimada por inmunoprecipitación con un anticuerpo específico para ALA-S mitocondrial, era incrementada en la fracción correspondiente a poliribosomas libres.

Posteriormente, la enzima sintetizada en citoplasma, debe ser transferida e integrada a la mitocondria. Ha sido demostrado que el hemo y otras sustancias (39) son capaces de inhibir la transferencia de ALA-S de citoplasma a mitocondrias.

Fueron también ampliamente estudiadas las propiedades de ambas enzimas, citosólica y mitocondrial. La determinación de estos parámetros se vio dificultada por la tendencia de la ALA-S a formar grandes agregados o complejos consigo mismo y con otras proteínas, exhibiendo pesos moleculares muy heterogéneos. Así se han determinado, en hígado de rata, tamaños moleculares entre 650.000 y 70.000 de acuerdo a las condiciones experimentales empleadas (31, 34, 36), coincidiendo, empero, en que el peso molecular de la enzima citosólica es mayor que el de la mitocondrial.

Ohashi y Kikuchi en 1979 (40) purificaron un complejo de ALA-S citosólica de hígado de rata que estaba constituido por 3 proteínas: una activa de peso molecular 110.000 y 2 inactivas de 120.000 y 75.000. Si la proteína activa era sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, se obtenía una única banda de peso molecular aparente 51.000, lo que sugería la presencia de un dímero. Observaron también que, in vitro, la proteína activa no penetraba a mitocondrias si no estaba acompañada de las 2 proteínas inactivas, lo que les asignaba un papel importante en la tras-locación a mitocondrias (41).

Posteriormente, Nakakuki y col.(42), purificaron casi a homogeneidad ALA-S citosólica con un tratamiento previo con papaína y la consecuente digestión de proteínas acompañantes en el complejo y sin pérdida de actividad enzimática. Determinaron un peso molecular aparente de 110.000, por gradiente de sacarosa. En el mismo trabajo prepararon un antisuero de cone-

jo contra la ALA-S purificada de la fracción citosólica y encontraron que ambas ALA-S, mitocondrial y citosólica, eran inmunológicamente idénticas. Estos resultados indicaban que la ALA-S citosólica es un precursor en tránsito a la mitocondria.

Por otra parte, Srivastava y col.(43) purificaron ALA-S de mitocondrias de hígado de rata, observando un peso molecular de 70.000. Esta molécula provendría de un precursor de 76.000 también aislado, que podía ser proteolíticamente modificado sin pérdida de actividad enzimática. Postularon que ALA-S se sintetizaría como un precursor de alto peso molecular que sería procesado durante o inmediatamente después de la transferencia a mitocondrias.

Simpson y Beattie (44), purificando ALA-S mitocondrial, describieron una proteína no catalítica, de peso molecular 57.000, que era capaz de activar la enzima ALA-S. Este activador sería el responsable de la agregación y podría tener efecto regulatorio al participar en la estructura cuaternaria de la ALA-S mitocondrial.

Whiting y Granick (45), purificaron ALA-S de mitocondrias de embriones de pollo y observaron un peso molecular de 87.000 para la enzima nativa, compuesta por 2 subunidades de 49.000.

A diferencia de lo observado en mamíferos y pollos adultos, no se pudo observar acumulación de ALA-S en citosol luego de la administración de AIA o DDC, en hígado de embriones de pollo, a pesar que la cantidad total de ALA-S se encontraba aumentada entre 300 y 500 veces (38, 46). Recientemente, Srivastava y col.(47) han detectado por primera vez en hígado de embriones de pollo, un precursor de ALA-S en la fracción citosólica que correspondió a una proteína de 74.000 de peso molecular, mientras que en la fracción mitocondrial aislaron una molécula de peso molecular 68.000. La detección del precursor se realizó por técnicas inmunoquímicas, ya que no se pudo medir la actividad enzimática.

En 1984, Watanabe y col.(48) estudiaron la relación entre la secuencia extra del precursor y la estructura cuaternaria y las propiedades catalíticas de la ALA-S, en hígado de pollos adultos. Ambas, citosólica y mitocondrial, se presentan en forma de dímeros y tienen actividad y propiedades cinéticas similares, sugiriendo que el centro activo de la enzima no se ve influenciado por la presencia de la secuencia extra. Encontraron diferencias en el punto isoeléctrico y determinaron que la secuencia polipeptídica extra del precursor citosólico, de aproximadamente 6.000 de peso mo-

lecular, era rico en aminoácidos básicos. Sugirieron que esta diferencia puede ser importante en la traslocación de la proteína enzimática a mitocondrias.

La existencia de una proteína activa de mayor peso molecular en la fracción citosólica, que es inmunológicamente idéntica a la mitocondrial y tiene las mismas propiedades cinéticas, sugiere que se trata del producto primario del RNA mensajero de ALA-S en tránsito a la mitocondria y que es procesado postraduccionalmente. La función del polipéptido extra del precursor, así como la secuencia de eventos necesarios para el procesamiento, transporte e integración a la mitocondria como producto maduro, son aun desconocidos. Recientemente Keng y col.(49) han demostrado que una secuencia de 9 residuos de aminoácidos del extremo aminoterminal de ALA-S de *S.cerevisiae*, caracterizados por su hidrofobicidad, es suficiente para traslocar a la matriz mitocondrial una proteína citosólica como la beta-galactosidasa.

La ALA-S es una enzima relativamente inestable. El tiempo de vida media de la que se encuentra en la fracción citosólica del hígado, medido por el descenso de la actividad de la enzima luego de una inyección de cicloheximida, es de sólo 20 minutos (34), mientras que la vida media aparente de la mitocondrial es de 60-70 minutos bajo condiciones experimentales comparables (20, 34). Esta escasa estabilidad ha sido adjudicada por diversos autores a la acción de proteasas (42, 47). Recientemente Beattie y col. (50) han encontrado que ALA-S de hígado de rata, tanto citosólica como mitocondrial, están sujetas a una inactivación dependiente de la temperatura, la que podría impedirse por el agregado de fosfato de piridoxal. La pérdida de actividad de la enzima no involucraría digestión proteolítica, sino, en una etapa inicial, la pérdida del cofactor, fosfato de piridoxal y, posteriormente, la inactivación de la apoproteína a temperaturas arriba de 22°C.

La enzima ALA-S ha sido purificada y caracterizada en una gran cantidad de tejidos de mamíferos además del hígado. Ha sido descrita en médula ósea (51), cerebro (52), corazón (53), músculo esquelético (54), riñón (55), bazo (56), testículos (57), adrenales (58), glándula de Harder (59), etc. La existencia de al menos dos isoenzimas de ALA-S en ratas fue sugerida por Yamamoto y col.(60), al demostrar la falta de reactividad cruzada entre ALA-S de eritrocitos y anticuerpos anti-ALA-S de hígado. Estos autores sugieren además que debe haber al menos 2 genes diferentes para esta enzima en ratas.

La actividad basal de ALA-S en tejidos normales es generalmente baja; en hígado de rata oscila entre 10 y 50 nmoles de ALA sintetizados por hora y por gramo de tejido (61), valores que son similares a los encontrados en el hígado humano.

Reviste particular interés desde el punto de vista fisiológico y regulatorio el hecho que la actividad de ALA-S mitocondrial en hígado de rata fetal es aproximadamente 10 veces mayor que la de adultas (62) siendo aquella enzima, además, de menor peso molecular. La actividad decae luego lentamente hasta llegar a valores de la rata adulta pocos días después del nacimiento. Durante el período fetal la enzima no es inducible por drogas y es refractaria a la represión por hemo. Woods y Murthy (63) postularon que la ALA-S fetal es funcionalmente activa y similar a la adulta pero que su regulación es distinta, lo que podría ser explicado en términos de diferencias en la función mitocondrial en ambas etapas del desarrollo.

Borthwick y col.(64) construyeron una genoteca de DNA complementario (cDNA) a partir de mRNA, de la que fueron identificados clones conteniendo secuencias codificadoras de ALA-S hepática. Estimaron por análisis de "Northern blot" en 2.800 pares de bases el tamaño del mRNA para ALA-S de hígado de embriones de pollo. A partir de uno de esos clones dedujeron la secuencia nucleotídica completa y, por lo tanto, la secuencia aminoacídica del precursor de ALA-S (65). Este precursor consiste en una proteína madura de 579 aminoácidos, con un extremo N-terminal de 56 aminoácidos preponderantemente básicos. Recientemente, el mismo grupo de investigadores (66) ha aislado el gen completo de ALA-S de hígado de pollo. Este es de 6,9 kb de largo y contiene 10 exones; los exones 4 a 10 codificarían para la enzima activa, mientras que los tres primeros lo harían para la secuencia que se encuentra sólo en el precursor citosólico. Entre éstos, el exón 1 codificaría para la secuencia necesaria para el transporte a mitocondrias.

En una línea de trabajo semejante, Yamamoto y col. (67) aislaron un cDNA que codifica para ALA-S de eritrocitos de pollo. Sugirieron que los diferentes mRNA<sup>ALA-S</sup> detectados en distintos tejidos de pollo podrían ser transcriptos de una familia de genes estrechamente relacionados en la secuencia nucleotídica y que cada uno estaría regulado de una manera específica, de acuerdo al estado de desarrollo del animal.

### Biosíntesis de porfobilinógeno

El precursor tetrapirrólico de todos los tetrapirroles naturales es el porfobilinógeno (PBG). Éste se forma por condensación de 2 moles de ALA con la pérdida de 2 moles de H<sub>2</sub>O. La enzima responsable de la catálisis de esta reacción es la ácido 5-aminolevulínico dehidrasa (ALA-D) [5-amino-levulinato hidrolasa EC 4.2.1.24].

Esta enzima citosólica soluble (68) ha sido purificada de un gran número de fuentes tales como bacterias (69), hongos (70), plantas (71), aves (72) y mamíferos (73). Recientemente Gibbs y col.(74) purificaron 35.000 veces la ALA-D de eritrocitos humanos con un rendimiento del 70%.

El mecanismo de la reacción, que ha sido propuesto por Nandi y Shemin (75), tiene lugar en una serie de etapas. En la primera, una molécula de ALA forma una base de Schiff a través de la combinación de su grupo ceto con un grupo amino de un residuo lisina del sitio activo de la enzima (76). Esta molécula de ALA luego se combina con otra molécula de ALA, como partes de una reacción de Knorr, que involucra una condensación intramolecular del carbanión de la base de Schiff con el grupo carbonilo de la segunda molécula de ALA. Posteriormente, este compuesto elimina H<sub>2</sub>O y el grupo amino de la última molécula de ALA desplaza el grupo amino de la enzima para formar PBG.

Para lograr una correcta disposición espacial en la reacción, Battle y Stella (77) sugirieron que la segunda molécula de ALA se encuentra también unida a la superficie de la enzima dentro de un "agujero" apropiado.

Barnard y col.(78) demostraron la participación de dos residuos cisteínas, a través de sus grupos SH, que actuarían en la catálisis ácido-base requerida para las secuencias de protonación-desprotonación enzimática en la síntesis de PBG.

ALA-D presenta características de una enzima sulfhidrúlica y es sensible a reactivos tiólicos y metales pesados. Inhibidores de grupos SH, tales como iodoacetamida y p-cloromercuriobenzoato (PCMB), tienen un efecto inhibitorio (78), el cual puede ser eliminado por la adición de glutatión, 2-mercaptoetanol, cisteína, ditiotreitól y cualquier otro reactivo sulfhidrúlico.

Numerosos estudios in vivo e in vitro han demostrado que ALA-D es muy sensible a la acción del plomo (79, 80), lo que conduce a una marcada

inhibición de su actividad. Se ha propuesto que el plomo inhibe la enzima por su acción directa sobre los grupos SH, lo cual puede ser revertido por el agregado de algún reactivo tióxico (81).

Se han realizado detalladas investigaciones de la estructura cuaternaria de ALA-D obtenida de diferentes fuentes. Todas ellas indican que esta enzima tiene un peso molecular de 280.000 y está compuesta por 8 subunidades (82). Las 8 subunidades estarían ubicadas en los vértices de un cubo, observando una simetría dihédrica  $D_4$ . Sólo 4 de las 8 subunidades reaccionarían con el sustrato, cada una formando una base de Schiff con una molécula de ALA (83).

El mecanismo de acción es semejante para células procariotas y eucariotas. Sin embargo, los requerimientos de iones metálicos son completamente diferentes. La enzima de bacterias fotosintéticas (84) requiere  $K^+$ , pero ALA-D de bacterias no fotosintéticas (69) y de plantas (71) necesitan  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ . La enzima de células eucariotas no tiene requerimientos de metal pero son inhibidas por EDTA (85). Chen y Neilands (86) demostraron que el Zn(II) es esencial para la actividad enzimática en mamíferos. Tratando la enzima purificada de hígado bovino con agentes quelantes obtuvieron la apoenzima libre de metal, cuya actividad fue restaurada por el agregado de Zn(II). El Cd(II) fue el otro ión metálico con el que se restablecía la actividad de la apoenzima (87).

El papel del  $Zn^{2+}$  en la actividad enzimática y el número de grupos SH involucrados en la reacción no ha sido aun dilucidado. Tsukamoto y col. (88) sugirieron que la actividad enzimática es dependiente de la presencia de dos grupos SH y que el  $Zn^{2+}$  no sería absolutamente necesario para la actividad sino que se requeriría para prevenir la autooxidación de los grupos SH esenciales, formando uniones de coordinación.

Por otra parte Bevan y col. (87) encontraron 4 átomos de  $Zn^{2+}$  por octámero de ALA-D de hígado bovino. El metal se uniría al sitio activo a través de grupos SH, pero no participaría en la unión del sustrato ni en el mantenimiento de la estructura cuaternaria.

Seehra y col. (89) informaron que la presencia de Zn(II) no sería obligatoria para la actividad de ALA-D y que podría ser innecesaria trabajando a concentraciones altas (20 mM) de un reactivo tióxico. De acuerdo a su modelo, el Zn(II) no sería un cofactor sino que favorecería el mantenimiento de la ALA-D en una conformación catalíticamente viable. Por último, Jaffe y Hanes (90) demostraron con ALA-D bovina, que el Zn(II) no es nece-

sario para la formación de la base de Schiff entre el sitio activo de la enzima y la molécula de ALA. Gibbs y col.(91) sugirieron por su parte un papel estructural para el ión metálico más que una acción catalítica.

Estudios realizados en distintas cepas de ratones demostraron que la actividad de ALA-D se encuentra bajo el control genético de 2 alelos del locus levulinato (92, 93). Estos alelos transmiten sus caracteres en forma codominante y mantienen un estrecho control genético sobre la síntesis de la proteína enzimática.

Ha sido demostrado in vitro que ALA-D puede ser inhibida por hemo y protoporfirina IX (94), lo cual podría sugerir una función regulatoria de esta enzima en la biosíntesis del hemo. Sin embargo, en todos los tejidos estudiados, la actividad de ALA-D es mucho más alta que la de ALA-S (alrededor de 80 veces en el hígado humano)(61) y mayor también su tiempo de vida media. Así, al menos en condiciones fisiológicas, ALA-D no tendría efecto regulatorio en la síntesis del hemo. De todos modos, trabajos in vitro sugieren que esta enzima puede ser limitante de la velocidad de síntesis en determinadas condiciones (94).

Wetner y col.(95) han clonado y secuenciado parcialmente el cDNA de ALA-D de hígado humano.

### Biosíntesis de Uroporfirinógeno III

El siguiente paso en la biosíntesis del hemo es la condensación de 4 moléculas de PBG para formar el primer intermediario macrocíclico: el uroporfirinógeno III.

Hay dos enzimas involucradas en la reacción de condensación: la porfobilinógeno deaminasa (PBGasa) o hidroximetilbilano sintetasa [porfobilinógeno amonio-liasa (polimerizante) EC 4.3.1.8] y la uroporfirinógeno III cosintetasa [uroporfirinógeno III isomerasa EC 4.2.1.75]. Ambas enzimas han sido aisladas y parcialmente purificadas de numerosas fuentes vegetales, bacterianas y animales (96-99), incluyendo eritrocitos humanos (100). Estas enzimas se encuentran en el citoplasma y la actividad de la primera de ellas, en condiciones normales, es la limitante de la velocidad de la reacción.

La PBGasa es una enzima de bajo peso molecular (30-40.000) y relativamente estable al calor. La uroporfirinógeno III cosintetasa es una pro-

teína de mayor peso molecular (60-65.000) y muy lábil frente a la temperatura (101).

Cuando la PBGasa actúa sola *in vitro*, cataliza la condensación secuencial cabeza-cola de 4 moles de PBG formando el intermediario simétrico uroporfirinógeno I y liberando 4 moles de  $\text{NH}_3$  (102). Este compuesto no es sustrato para la uroporfirinógeno III cosintetasa, como tampoco lo es el PBG.

El intermediario obligado en la biosíntesis del hemo, el uroporfirinógeno III, es formado solamente cuando ambas enzimas actúan concertadamente. El papel de la segunda enzima sería el de permitir la inversión del anillo D en la molécula de porfirinógeno para producir el intermediario correcto.

El mecanismo por el cual ambas enzimas interactúan para formar el isómero de tipo III no está aun aclarado, aunque han sido formuladas numerosas hipótesis. Frydman y col.(103) en base a estudios realizados con 2-aminopirrilmetanos sintéticos (104), propusieron un mecanismo que se basa en que la uroporfirinógeno III cosintetasa no es una enzima en sí misma, sino una proteína específica que modificaría la actividad de la PBGasa sobre la condensación del PBG, actuando desde el comienzo de la reacción, sintetizando un dipirrol invertido, cabeza-cabeza, que luego se transformaría en un tripirrol y por último en el uroporfirinógeno III. Este mecanismo implica que no hay pirrilmetanos intermediarios comunes en las reacciones catalizadas por la PBGasa y por el complejo PBGasa-cosintetasa.

Por otro lado, Battersby y McDonald (105, 106) en contraposición a la hipótesis de Frydman, sostuvieron que la reacción procedería a través de una condensación secuencial cabeza-cola de los 4 PBG, catalizada por la PBGasa, para dar un intermediario no anular. Este intermediario, identificado como hidroximetilbilano (107-109), sería el sustrato de la cosintetasa que, por un reordenamiento intramolecular del anillo D, daría el producto final: uroporfirinógeno III (figura 6).

Finalmente, estudios de RMN realizados por el grupo de Scott, sugirieron que la PBGasa es una enzima ciclizante (110, 111) que forma, por condensación de 4 moléculas de PBG, un compuesto anular, el preuroporfirinógeno. Este sería el sustrato de la uroporfirinógeno III cosintetasa que lo convertiría a uroporfirinógeno III (112). En ausencia de cosintetasa, el preuroporfirinógeno se transformaría químicamente en uroporfirinógeno I. Así, ambas enzimas actuarían independientemente pero en forma secuencial en





la conversión de PBG a uroporfirinógeno III. Sin embargo, en recientes revisiones de sus trabajos, este grupo de investigadores se inclinó por el hidroximetilbilano como el intermediario más probable de la reacción y producto de la enzima PBGasa (113, 114).

Jones y col.(115) han realizado exhaustivos estudios sobre la estereoquímica de la reacción, demostrando que las 4 posiciones metileno de los porfirinógenos de la serie III y del hidroximetilbilano son producidos a través de procesos estereoespecíficos.

### Conversión de Uroporfirinógeno III a Coproporfirinógeno III

El uroporfirinógeno III, sintetizado en la etapa anterior, es seguidamente transformado en coproporfirinógeno III a través de la decarboxilación de sus cadenas laterales acéticas (116). Esta reacción enzimática es catalizada por la uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D) [uroporfirinógeno III carboxiliasa EC 4.1.1.37]. Ha sido purificada, en algunos casos a homogeneidad, de eritrocitos (117) e hígado de pollo (118), eritrocitos (119, 120) e hígado humanos (121). Esta enzima es soluble y está localizada en la fracción citosólica de la célula.

La actividad de la URO-D es inhibida, in vitro, por iones metálicos y compuestos capaces de unirse a grupos SH, como Fe(II) (122, 123) y Hg(II) (116) e iodoacetamida, debido a que es necesario al menos un grupo SH para mantener la actividad enzimática (124). Como era de esperar, glutatión y cisteína incrementan la actividad de la enzima, mientras que el oxígeno, probablemente por oxidación del sustrato, la disminuye.

La remoción de las cuatro cadenas de ácido acético del uroporfirinógeno III ocurre secuencialmente, por lo tanto pueden encontrarse porfirinógenos intermediarios de 7, 6 y 5 grupos carboxilos (125), aunque sus concentraciones, en condiciones normales, son pequeñas y dependen, según Straka y Kushner (124), del cociente [Uroporfirinógeno III]/[enzima].

García y col.(117) encontraron que la decarboxilación procede en dos etapas, la primera, más rápida, en la que ocurre la primera decarboxilación y la segunda etapa, más lenta, en la que el heptaporfirinógeno se convierte paso a paso en coproporfirinógeno III. Jackson y col.(126) demostraron que la decarboxilación secuencial de uroporfirinógeno III a coproporfirinógeno III, transcurre en forma ordenada, comenzando por el anillo D

y, siguiendo en el sentido de las agujas del reloj, los anillos A, B y por último el C.

De acuerdo a estos resultados, Smith y Francis (127) sugirieron que el reconocimiento y remoción de la cadena acética del anillo D podría ocurrir en un sitio distinto de las demás decarboxilaciones. Verneuil y col.(120) postularon la existencia de una sola proteína enzimática que llevaría a cabo todas las decarboxilaciones y que contendría, al menos, 2 sitios activos. Recientemente, Elder y col.(128), utilizando técnicas de inmunoprecipitación e inmunoelectroforesis, demostraron que la actividad de URO-D reside en una sola proteína.

Elder y Urquhart (129), comparando URO-D de eritrocitos e hígado, descartaron la existencia de isoenzimas en humanos, atribuyendo sus diferencias, a modificaciones postraduccionales debidas a proteólisis u oxidación de grupos tioles.

Grandchamp y col.(130) sintetizaron URO-D en un lisado de reticulocitos libre de células bajo la dirección de mRNAs aislados de hígado fetal humano y reticulocitos humanos. Posteriormente clonaron un cDNA de mRNA de URO-D de rata de aproximadamente 1500 nucleótidos (131). Más recientemente Roméo y col.(132) han establecido la secuencia de un cDNA obtenido de mRNA de URO-D de pulmón humano. Demostraron, además, que esta enzima, cuya estructura primaria es de 367 aminoácidos, está codificada por un solo gen. El análisis de la expresión de este gen indicó la existencia de una sola especie de mRNA, tanto en eritrocitos como en otros tejidos, y que su acumulación se debería a una activación transcripcional del gen de URO-D.

### Conversión de Coproporfirinógeno III a Protoporfirinógeno III

El coproporfirinógeno III formado en el citosol es rápidamente transferido a mitocondrias donde sufre la decarboxilación y oxidación de los grupos propiónicos en posiciones 2 y 4 dando el protoporfirinógeno IX, con 2 grupos vinilo en dichas posiciones.

La enzima coproporfirinógeno oxidasa [coproporfirinógeno decarboxilasa oxidativa EC 1.3.3.3], responsable de esta reacción, es una enzima mitocondrial (133) que ha sido aislada de una gran variedad de microorganismos (134), aves (135) y mamíferos (136). Elder y Evans (137) encontraron que, en hígado de rata, esta enzima está situada en el espacio intermembra-

na de la mitocondria.

La reacción es altamente específica para el coproporfirinógeno III y, en aquellos preparados obtenidos de organismos aeróbicos, el requerimiento de oxígeno es absoluto (133).

La reacción transcurre en forma secuencial obteniéndose un intermediario monovinílico denominado harderoporfirinógeno, dado que fue aislado por primera vez de la glándula de Harder de la rata (138). Se determinó que éste es el 2-vinilporfirinógeno (139), sugiriéndose que el proceso de decarboxilación comenzaría por el anillo A. El mecanismo y la estereoquímica de la reacción han sido estudiados en eritrocitos de pollo en dos laboratorios (140, 141). El coproporfirinógeno III es decarboxilado oxidativamente a harderoporfirinógeno en el sitio activo de la enzima, cuya configuración es tal que sólo acepta el grupo propiónico en posición 2. Esta molécula gira, luego, en sentido antihorario, para que el segundo grupo propiónico sea degradado en el mismo sitio sobre la superficie de la enzima. La decarboxilación ocurre con la pérdida de uno de los hidrógenos del carbono beta de las cadenas de ácido propiónico, siendo el hidrógeno pro-S en ambos casos. Los hidrógenos del carbono alfa no están involucrados en la reacción. Zaman y Akhtar (141), propusieron un mecanismo de reacción a través de la formación de una base de Schiff.

Recientemente, Camadro y col.(142) han purificado a homogeneidad la coproporfirinógeno oxidasa de *S.cerevisiae*. Esta enzima es un dímero de peso molecular 70.000 con subunidades idénticas. Presenta requerimientos de grupos SH y es activada por fosfolípidos.

### Oxidación de Protoporfirinógeno IX

La modificación final sobre el anillo tetrapirrólico, anterior a la inserción del metal, es la oxidación del protoporfirinógeno IX a protoporfirina IX, durante la cual se pierden 6 átomos de hidrógeno.

La existencia de una enzima específica para esta etapa ha sido establecida recientemente. Poulson y Polglase (143) en levaduras y Poulson (144) en hígado de rata, obtuvieron evidencias de una enzima mitocondrial, la protoporfirinógeno oxidasa, que cataliza la oxidación a protoporfirina IX. Jackson y col.(145) comprobaron que la reacción es estereoespecífica teniendo lugar sólo de un lado del anillo porfirínico, lo cual no podría

ocurrir si la oxidación fuera no enzimática.

La enzima, tanto de levaduras como de mamíferos, requiere oxígeno molecular (143, 144) y tiene una alta especificidad de sustrato, no reaccionando con uro- y coproporfirinógenos, aunque lo hace parcialmente con monovinilharderoporfinógeno (139). Camadro y col.(146) purificaron la protoporfirinógeno oxidasa de hígado humano. Esta enzima tiene un peso molecular de 32.000 y es sensible a la inhibición por algunas metaloporfirinas tales como Mn- y Co-protoporfirinas y en un grado menor por Cd-, Ni- y Fe-protoporfirinas.

El estudio de la localización submitocondrial de la protoporfirinógeno oxidasa fue realizado por Deybach y col.(148). Esta enzima estaría ubicada dentro de la membrana interna de la mitocondria. Grandchamp y col. (147) subrayaron la importancia de la localización submitocondrial de esta enzima y la de la coproporfirinógeno oxidasa para la transferencia de los sustratos a la membrana interna (figura 7).

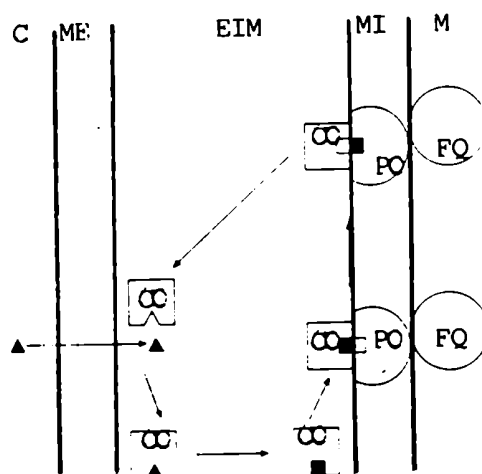


Figura 7: Probable ubicación de las tres últimas enzimas del camino metabólico del hemo. Abreviaturas: C, citoplasma; M, matriz; ME, membrana externa; MI, membrana interna; EIM, espacio intermembranas; CO, coproporfirinógeno oxidasa; PO, protoporfirinógeno oxidasa; FQ, ferroquelatasa.

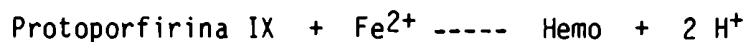
(▲), coproporfirinógeno; (■), protoporfirinógeno; (□), sitio activo desocupado.

Poulson y Polglase (149) determinaron que, en levaduras, la enzima es sintetizada en mitocondrias, a diferencia de las otras enzimas del camino metabólico del hemo. Kolarov y col.(150) demostraron que la protoporfirinógeno oxidasa de hígado de rata, no es sintetizada en mitocondrias, en contraste con lo encontrado en levaduras, dado que no es inducida por triiodotironina, un inductor de síntesis de proteínas mitocondriales.

El mecanismo de la reacción está aun poco aclarado. Recientemente Jones y col.(115) sugirieron que de los 4 átomos de hidrógeno en posiciones meso que se pierden durante la transformación a protoporfirina IX, 3 de ellos son removidos como hidruros y el restante como protón.

### Formación de Hemo

La última etapa en la biosíntesis del hemo es la incorporación del ión ferroso en la protoporfirina IX, reacción catalizada por la ferroquelatasa o hemo sintetasa [protohemo ferro-liasa EC 4.99.1.1]



Esta reacción puede llevarse a cabo también en forma no enzimática, según han demostrado diversos autores (151, 152). Kassner y Walchack (152) cuestionaron particularmente el papel de una enzima en la última etapa de formación de hemo, ya que encontraron que la formación de hemo no enzimática se producía a una velocidad comparable a la observada con preparaciones enzimáticas.

Sin embargo ha sido demostrado repetidas veces la síntesis de hemo catalizada por extractos celulares, en condiciones en las cuales no habría reacción significativa sin la presencia de material celular (153, 154). Las actividades de estos extractos eran sensibles al calor, dependientes de la temperatura y exhibían un pH óptimo. El fraccionamiento subcelular y la aplicación de métodos de purificación de proteínas resultaba en fracciones con actividad específica incrementada, las cuales no eran dializables, indicando que la actividad catalítica residía en una proteína. Más recientemente ha sido demostrada la inhibición de la síntesis de hemo in vitro por anticuerpos de ferroquelatasa bovina (155). Así, se tienen numerosas evidencias del requerimiento de una enzima en la última etapa de formación de hemo, aunque sin descartar la posible contribución de la reacción no enzi-

mática.

Actividad de ferroquelatasa ha sido detectada en organismos tan diversos como bacterias (156-158), algas (159), levaduras (160), plantas (153, 161) y animales (162-164). En cuanto a tejidos humanos, la ferroquelatasa ha sido estudiada en médula ósea (165), reticulocitos (166) e hígado (167) entre otros.

En eucariontes, la ferroquelatasa está localizada en la cara interior de la membrana interna de la mitocondria (168). Los primeros intentos para su purificación fueron infructuosos debido a la pérdida de actividad durante su aislamiento. Este paso requiere la solubilización de la enzima de la membrana mitocondrial usando detergentes.

En los últimos años, varios autores han purificado ferroquelatasa de diversas fuentes. Mailer y col.(169) la purificaron de hígado de rata por cromatografía de afinidad, utilizando 2-vinil-4-(3'-N-3"-aminopropil)-acrilamidauteroporfirina como ligando. La enzima muestra una sola banda en electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y peso molecular aparente de 63.000. Taketani y Tokunaga, utilizando cromatografía por Blue Sepharose CL-6B, purificaron ferroquelatasa de hígado bovino (155) y de hígado de rata (170). Obtuvieron proteínas de peso molecular 240.000 y 42.000 para la enzima de hígado de rata en sus formas nativa y desnaturalizada, respectivamente, y de 200.000 y 40.000 en similares condiciones para la de hígado bovino. Estos resultados sugerirían que la ferroquelatasa existiría como un oligómero de 5 ó 6 subunidades. Recientemente, Hanson y Dailey (164) obtuvieron ferroquelatasa de eritrocitos de pollo purificada 200 veces y con un peso molecular aparente de 42.000.

Como en muchas otras enzimas que se encuentran estrechamente unidas a membrana, los lípidos juegan un papel importante en la actividad de ferroquelatasa. Mazanovska y col.(171) encontraron que la remoción de los lípidos, con acetona u otros solventes orgánicos, de cromatóforos de *R. spheroides* y de mitocondrias de hígado de cerdo, causaba una marcada reducción en la actividad de ferroquelatasa, la que podía ser restaurada por agregado de distintos lípidos. Posteriormente, Simpson y Poulson (172) trabajando con preparaciones de ferroquelatasa de hígado de rata libres de lípidos, demostraron que la adición de ácidos grasos o fosfolípidos, restauraba la actividad enzimática. Un efecto activador de los lípidos también fue encontrado en fracciones purificadas de hígado de rata (170), bovino (173) y eritrocitos de pollo (164), aunque la activación obtenida por estos

autores varía en su magnitud y efectividad de los lípidos utilizados. También ha sido informado que la presencia de ácidos grasos incrementa la formación de hemo no enzimático (174).

Llambías (154) y Porra y Jones (163) demostraron que la ferroquelatasa de hígado de cerdo era completamente inactiva en condiciones aeróbicas y sugirieron que esto era debido a la oxidación del ión  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$  que no es sustrato de la enzima. Resultados similares sobre el efecto inhibitorio del oxígeno sobre la actividad de ferroquelatasa, fueron obtenidos por otros autores, sugiriéndose otras tantas hipótesis: inactivación de la enzima por oxidación de grupos tioles esenciales para la actividad (175) o inhibición indirecta a través de la producción de un peróxido, el cual oxidaría una fracción lipídica necesaria para mantener la actividad enzimática (171).

Los espectros de absorción visible y ultravioleta de ferroquelatasa purificada (158, 170) no muestran evidencias de la presencia de grupos prostéticos cromofóricos, lo que revela que no hay requerimientos de cofactores de este tipo. Sin embargo Labbe y Nielsen (176) sugirieron que el fosfato de pirodoxal aumentaría la actividad de ferroquelatasa en ratones mantenidos con una dieta deficiente en piridoxina, aunque estos resultados no pudieron ser confirmados por otros autores.

Numerosos estudios sobre la especificidad de la ferroquelatasa por sus sustratos demuestran que esta enzima puede utilizar otros compuestos de los fisiológicos. Deuteroporfirina, mesoporfirina, hematóporfirina y 2,4--diacetildeuteroporfirina son mejores sustratos que la protoporfirina IX (155, 177). El mejor sustrato para la ferroquelatasa es una porfirina en la cual no hay sustituyentes en los anillos A y B (178). La esterificación o sustitución de las cadenas laterales de ácido propiónico en los anillos C y D de la protoporfirina IX da compuestos que no son sustratos, indicando que estos sustituyentes pueden ser muy importantes para la formación del complejo enzima-sustrato (178).

Otros metales divalentes además del  $Fe(II)$  pueden ser incorporados enzimáticamente a protoporfirina IX, como el  $Zn(II)$ (167) y el  $Co(II)$ (168, 179). Si la incorporación de estos metales es catalizada por la misma proteína enzimática o por otras, es un problema que resta aun por resolver. Por otra parte, metales divalentes tales como  $Cu$ ,  $Mn$ ,  $Pb$  y  $Hg$  inhiben marcadamente la actividad de ferroquelatasa (170).

Labbe y Hubard en 1960 (175), sugirieron que la ferroquelatasa



contiene grupos SH que son esenciales para la actividad de la enzima. Estos resultados fueron confirmados posteriormente por otros autores, utilizando reactivos de grupos SH como: PCMB, arsenito de sodio, iodoacetamida entre otros (170, 180). Recientemente Dailey (181) demostró que el ión  $\text{Fe}^{2+}$  y no la porfirina puede proteger a la ferroquelatasa de la inhibición por N-etilmaleimida, postulando un modelo en el cual el hierro se uniría al sitio activo de la enzima a través de 2 grupos SH vecinales. Dailey y col. trabajando con ferroquelatasa purificada de *R. spheroides* (182) y de hígado bovino (182a), sugirieron que residuos arginilos del sitio activo de la enzima podrían estar involucrados en la unión de la porfirina, probablemente vía interacciones entre dichos residuos y la cadena lateral propionato de la porfirina. En un trabajo posterior, Dailey (183) realizó un estudio por anisotropía de fluorescencia del sitio activo de la ferroquelatasa bovina, describiéndolo como un "bolsillo" de carácter hidrofóbico que engloba al macrociclo porfirínico por todos sus laterales excepto uno.

Dailey y Fleming (173) propusieron un mecanismo de reacción para la catálisis de la formación de hemo por la ferroquelatasa. Estos autores postularon un modelo cinético secuencial BiBi, en el cual el hierro se une al sitio activo de la enzima antes que la porfirina, siendo el hemo el primer producto liberado, precediendo a la liberación de los 2 protones (fig.8).

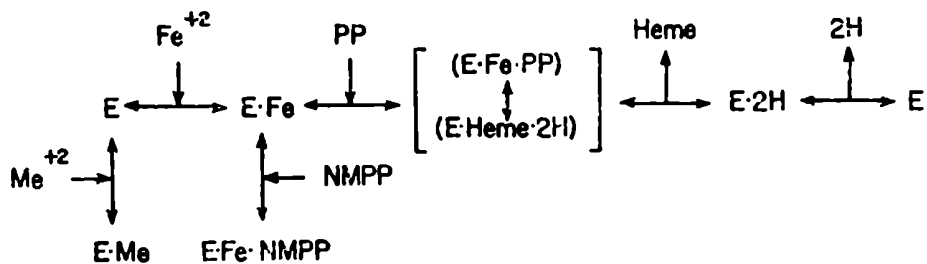


Figura 8: Mecanismo de reacción propuesto para la ferroquelatasa de hígado bovino.

La localización submitocondrial de la ferroquelatasa fue estudiada extensamente por Harbin y Dailey (184) con la utilización de reactivos SH impermeables a membranas, como el ácido 4-4'-dimaleimidilestilbeno-2,2'-di-

sulfónico. Concluyeron que la ferroquelatasa estaría incluida en la membrana interna de la mitocondria, con porciones de la protefna expuestas a ambos lados de la membrana, pero con el sitio activo orientado hacia el lado de la matriz mitocondrial. Esto significaría que la primera enzima del camino metabólico del hemo y principal paso de regulación, ALA-S, y la última, ferroquelatasa, estarían orientadas hacia la matriz mitocondrial. Este hecho ha sugerido que la orientación de la ferroquelatasa tendría un papel regulatorio en la célula (185).

Es importante señalar además, el hecho que las 3 últimas enzimas en la formación del hemo, coproporfirinógeno oxidasa, protoporfirinógeno oxidasa y ferroquelatasa se encuentran, aunque con distintas orientaciones, en la membrana interna de la mitocondria. Esto indicaría que estas 3 enzimas, no catalizan su respectiva reacción de una manera totalmente independiente una de otra, sino que actuarían como un complejo estable en la membrana. Debido a que los sustratos para esas enzimas son relativamente grandes, altamente reactivos y de características no polares, la existencia de tal complejo sería una manera eficiente de procesar tales compuestos, permitiendo que el producto de una enzima sea tomado inmediatamente como sustrato por la siguiente, sin abandonar en ningún momento el entorno de la membrana.

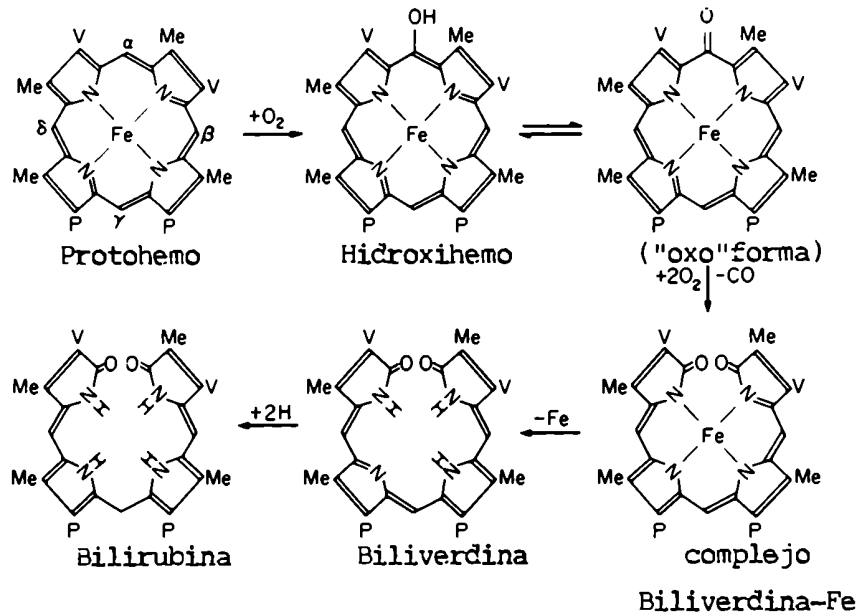
#### BIODEGRADACION DEL HEMO

La secuencia catabólica de la degradación del hemo comienza con la ruptura del macrociclo tetrapirrólico. El ataque oxidativo se produce en los puentes C que unen los cuatro anillos pirrólicos, resultando en la formación de tetrapirroles lineales conocidos como biliverdinas.

Esta reacción, catalizada por el sistema microsomal hemo oxigenasa [hemo:NADPH:oxígeno oxidoreductasa EC 1.14.99.3], es específica, principalmente, para la posición alfa del anillo, produciéndose la abertura del ciclo entre los anillos A y B, para producir la biliverdina IX alfa (186). La posible secuencia de la degradación del hemo se esquematiza en la figura 9.

El sistema hemo oxigenasa microsomal consiste en la enzima hemo oxigenasa y la NADPH-citocromo P-450 reductasa, requiriendo NADPH y oxígeno molecular.

**Figura 9:** Probable secuencia de la degradación del hemo catalizada por el sistema de la hemo oxigenasa.



La hemo oxigenasa purificada de hígado de rata y de cerdo tiene un peso molecular de 32.000 y une el hemo para formar un complejo 1:1 el cual exhibe propiedades similares a la hemoglobina y la mioglobina. La degradación del hemo procede, esencialmente, como una serie de oxidaciones autocatalíticas del hemo, el cual está unido a la enzima. Kikuchi y Yoshida (187) han postulado un posible mecanismo de reacción (figura 10).

La hemo oxigenasa puede ser inducida por hemo en varios tejidos, como el hígado, riñón y macrófagos, posiblemente en una inducción mediada por sustrato. Especialmente en hígado fue demostrado que la hemo oxigenasa puede ser inducida por diversas sustancias no hémicas tales como epinefrina e insulina (188), endotoxinas (189), bencenos halogenados (190), ciertos iones metálicos (191) y agentes inductores de interferones. La inducción por epinefrina, insulina y endotoxinas estaría mediada por hemo, mientras que en los casos restantes sería causada por algún mecanismo desconocido no relacionado con el hemo (187). Experimentos de traducción in vitro permitieron observar que los polisomas libres son el sitio principal de síntesis

de hemo oxigenasa, sugiriendo además que la inducción de la enzima estaría mediada por un aumento en la síntesis de mRNA (192).

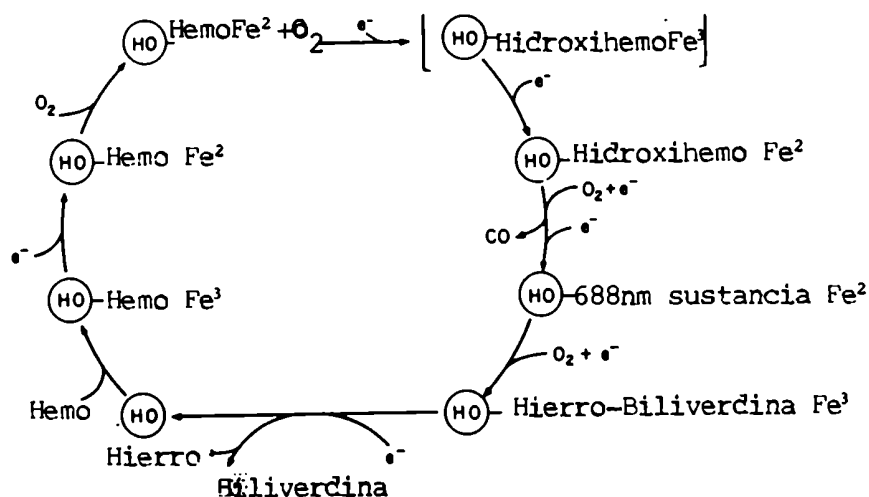


Figura 10:

Breslow y col.(193) han demostrado que la Sn-protoporfirina es un potente inhibidor competitivo de la hemo oxigenasa, constituyendo un potencial agente farmacológico para el tratamiento de la hiperbilirubinemia neonatal.

Recientemente, Shibahara y col.(194) han clonado el cDNA de la hemo oxigenasa de páncreas de rata y obtenido la secuencia nucleotídica y la estructura primaria de la proteína. La estructura primaria es de 289 aminoácidos, con un segmento hidrofóbico en el extremo carboxilo que podría ser importante para la inserción de la enzima en el retículo endoplásmico. Sugieren, también que el efecto inductor del hemo actuaría a nivel transcripcional.

En la mayoría de los invertebrados, el producto inicial de la degradación del hemo, la biliverdina, es excretada sin más transformaciones. Sin embargo, en los mamíferos este compuesto es transformado en bilirubina, una sustancia insoluble y altamente tóxica, por una reacción reductiva, catalizada por la biliverdina reductasa [bilirubina  $NAD(P)^+$  oxidoreductasa EC 1.3.1.24], que requiere NADPH. Esta enzima de peso molecular 70.000 no contiene flavina, hemo o metales y no es inhibible por reactivos sulfhidrúlicos (94).

Como consecuencia de la formación de este compuesto insoluble y tóxico, el organismo produce la conjugación de la bilirubina con ácido glucurónico para formar un compuesto más soluble y que puede ser excretado más fácilmente (195).

## CAPITULO 2: CITOCROMO P-450

Las monooxigenasas dependientes de citocromo P-450 desempeñan un papel de suma importancia en el metabolismo de un gran número de compuestos. Además de su función en la biosíntesis y metabolismo de sustancias endógenas tales como esteroides, lípidos, ácidos grasos y prostaglandinas, este sistema de transporte electrónico microsomal, puede convertir mediante reacciones oxidativas, sustancias tóxicas, tales como drogas, mutágenos y carcinógenos, en productos detoxificados, de características hidrofílicas, inocuas para el organismo y fácilmente eliminables.

Dependiendo de sus estructuras, estos xenobióticos pueden ser biotransformados por el citocromo P-450 vía N-, O-, S-dealquilación, hidroxilación aromática y alifática, deaminación, epoxidación y otras reacciones (196, 197).

La intervención de estas monooxigenasas conduce a la protección del organismo de agentes tóxicos extraños. Sin embargo, es sabido que la transformación metabólica, mediada por citocromo P-450, de ciertos compuestos inocuos, puede dar origen a intermediarios bioactivados que se unen irreversiblemente a macromoléculas celulares, iniciando el desarrollo de lesiones tóxicas o tumorígenas (198).

### Estructura del citocromo P-450

El modelo del sitio activo ha sido de utilidad para describir el comportamiento del citocromo P-450. En el sitio activo se encuentra la Fe-protoporfirina IX, ubicada en una "hendidura o depresión" relativamente abierta y de características hidrofóbicas, en la superficie de la apoproteína (196).

El hemo está unido por una combinación de fuerzas hidrofóbicas, atracciones electrostáticas y una o dos uniones covalentes coordinadas al ión metálico central. El hierro se encuentra en un estado de coordinación seis, cuatro de cuyas uniones son para los N de la estructura porfirínica y una quinta se une con el S de un resto cisteína de la cadena polipeptídica. La sexta unión de coordinación del Fe está ocupada por un ligando fácilmente intercambiable que puede ser H<sub>2</sub>O, en el estado nativo, libre de sustra-

to, del citocromo P-450. Cuando el Fe se reduce, esta sexta posición es el sitio de unión del oxígeno y también de otros ligandos diatómicos como el CO, cianuro y óxido de nitroso. Los sustratos hidrofóbicos se unen a la superficie de la proteína y/o del hemo a través de la sexta posición de coordinación (199, 200).

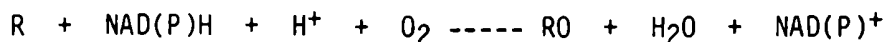
### Localización y especificidad de sustrato

La presencia de citocromo P-450 ha sido demostrada en mamíferos (201, 202), aves (203), bacterias (204) y plantas superiores (205). En los mamíferos ha sido encontrado en casi todos los tejidos, con especial abundancia en hígado, riñón y corteza adrenal. La fracción microsomal, obtenida a partir del retículo endoplásmico, es el locus primario para las flavoproteínas y hemoproteínas que constituyen el sistema de transporte electrónico microsomal, del cual el citocromo P-450 forma parte (206).

Salvo en casos muy especiales, como el de la *Pseudomonas putida*, en la cual el citocromo P-450 es altamente específico para la hidroxilación del camfor (204), en la gran mayoría de los organismos la especificidad de sustrato es muy amplia. En los distintos tejidos de mamíferos, el sistema de citocromo P-450 produce la biotransformación de una gran variedad de compuestos no relacionados estructuralmente, con la única salvedad de las adrenales que sólo metabolizan esteroides (197).

### Mecanismo de acción

El citocromo P-450 cataliza reacciones oxidativas con una estequiometría propia de una enzima oxidasa de función mixta:



Guengerich y McDonald (207) clasificaron estas reacciones en seis categorías: a) hidroxilación, es la formación de un alcohol en una posición metilo, metileno o metino; b) liberación heteroatómica, corresponde al clivaje oxidativo de una porción heteroatómica de la molécula; c) oxigenación heteroatómica, es la transformación de un sustrato que contiene un heteroá-

tomo en su correspondiente heteroátomo oxidado; d) epoxidación, es la formación de derivados oxiranos de olefinas y compuestos aromáticos; e) transferencia de grupos oxidativos, involucra una transferencia C 1,2 de un grupo con la incorporación de un carbonilo en el C-1; f) destrucción olefinica, corresponde a la inactivación del hemo del citocromo por un intermediario o producto enzimático.

El ciclo catalítico propuesto tiene 2 puntos centrales que no han sido aun completamente aclarados: el mecanismo de activación del oxígeno y el mecanismo de transferencia del oxígeno del complejo enzimático al sustrato (207). En la figura 11 se representan los pasos más importantes del mecanismo aceptado en la actualidad (208).

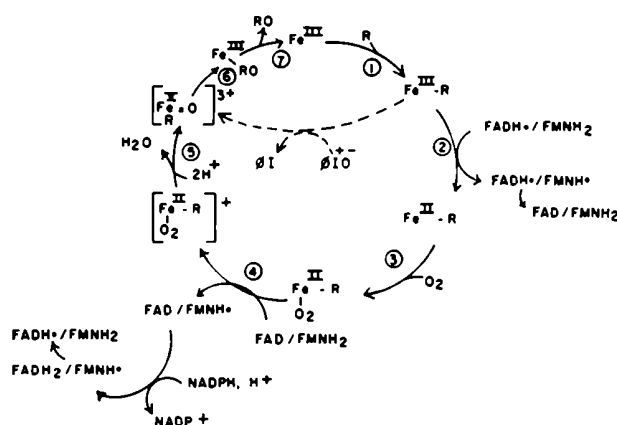


Figura 11: Ciclo catalítico propuesto para la reducción y oxidación del citocromo P-450.

La unión del sustrato a la enzima en estado férrico es rápida y estequiométrica. El complejo enzima-sustrato acepta un electrón mediante la flavoproteína NAD(P)H-citocromo P-450 reductasa (209), que contiene un FMN y un FAD, que dona el electrón del complejo  $FMNH_2/FADH'$  (210). El complejo sustrato-enzima en estado ferroso, une oxígeno molecular rápidamente para formar un complejo oxigenado. En este momento y sin la adición de otro electrón, el complejo puede decaer con la liberación de anión superóxido o, por dismutación, dar productos oxidados (211). Alternativamente, el complejo oxidado acepta un segundo electrón de la flavoproteína, o posiblemente del citocromo  $b_5$ , generando un complejo hierro-oxígeno activado (212). Va-

rios investigadores sugieren que este complejo es un perferril-oxígeno del tipo  $(Fe=O)^{3+}$  (200, 213). El oxígeno es luego transferido al sustrato. Luego el producto oxigenado es disociado y el citocromo P-450 queda en su estado fé-rrico original. Las etapas de adición del primer y segundo electrón y la etapa de transferencia del oxígeno al sustrato serían, aparentemente, las limitantes de la velocidad de reacción bajo diferentes condiciones (196).

Diversos autores han observado que los fosfolípidos estimulan la velocidad de metabolización del citocromo P-450 (214). Si bien la naturaleza de este efecto está sujeto a muchas especulaciones, es muy probable que el principal efecto de los fosfolípidos sea facilitar la formación del complejo citocromo P-450/NAD(P)H-citocromo-P-450 reductasa (215).

#### Inducción del citocromo P-450

Desde hace muchos años fue evidente que la actividad del sistema enzimático responsable del metabolismo de drogas, especialmente el citocromo P-450, podría ser rápidamente alterado y que existían profundas diferencias en la capacidad de diferentes especies para metabolizar el mismo compuesto.

Conney y Miller (216, 217) demostraron que la administración de 3-metilcolantreno o fenobarbital a animales producía un importante incremento en la actividad de la fracción microsomal hepática para catalizar, in vitro, la oxidación de una droga como el hexobarbital. Estos estudios también demostraron que la capacidad de inducción de la actividad de este sistema metabolizante de drogas, no estaba restringida a una de ellas, sino que la poseían una gran cantidad de compuestos no relacionados estructuralmente. Remmer y Merker (218) encontraron un rápido aumento en la cantidad de retículo endoplásmico liso luego de la administración de fenobarbital a animales, paralelamente al incremento en actividad de los microsomas aislados. Al mismo tiempo, Cooper y col.(219), demostraron que el citocromo P-450 era la enzima clave para la oxidación de muchas drogas y esteroides.

En 1972, Dehlinger y Schimke (220) demostraron que, el fenómeno primario responsable de la inducción del citocromo P-450, era el aumento en la velocidad de síntesis antes que una disminución en la degradación. Más tarde, Jacob y col.(221) sugirieron que la inducción por fenobarbital re-



quería la síntesis de novo de mRNA.

Usando microsomas de hígado de animales tratados con diferentes agentes inductores, se sospechó que había más de una enzima responsable del metabolismo oxidativo de diferentes drogas y que debía ocurrir una inducción selectiva de algunas de ellas. Hoy se sabe que el citocromo P-450 representa, en realidad, una familia de isoenzimas. Varios laboratorios han aislado y purificado múltiples formas de citocromo P-450 de hígado de ratas, conejos, ratones, pollos, etc. (222-224). Recientemente, Waxman (225), informó sobre el aislamiento de 12 isoenzimas de citocromo P-450 de hígado de rata, diferentes entre sí en sus características bioquímicas, inmunológicas y regulatorias.

Los pesos moleculares de varias formas de citocromo P-450 fueron determinados por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS, arrojando valores entre 47.000 y 60.000. El máximo de absorción del complejo con CO reducido de estas isoenzimas se encuentra entre 447 y 452 nm. Además de estas diferencias en sus propiedades físicas, estas isoenzimas presentan diferentes especificidades con respecto a sus sustratos, aunque algunas son superpuestas (226).

Con la obtención de anticuerpos específicos para una determinada isoenzima, fue posible confirmar el aumento de citocromo P-450 inmunoprecipitable, dentro de las 12 horas que siguen a la administración de fenobarbital (227). Los mismos autores demostraron la inhibición de la incorporación de aminoácidos radioactivos en citocromo P-450 con actinomicina D, concluyendo que la inducción por fenobarbital era mediada por un aumento en la síntesis de mRNA. Resultados similares fueron obtenidos en otros laboratorios tratando ratas y conejos con 3-metilcolantreno o beta-naftoflavona (228, 229).

Estudios de traducción in vitro, mostraron que el peso molecular del citocromo P-450 sintetizado de novo por inducción con fenobarbital, era idéntico al purificado de hígado de rata (230). Esto significa que no existía procesamiento proteolítico de un precursor de mayor peso molecular antes de su inserción en el retículo endoplásmico. Técnicas de hibridización con cDNA específicos para citocromo P-450 inducido por fenobarbital y 3-metilcolantreno, demostraron, concluyentemente, que dicha inducción es a nivel transcripcional por aumento de síntesis del mRNA correspondiente (231, 232).

Fujii-Kuriyama y col.(233) determinaron por primera vez la secuen-

cia de aminoácidos del citocromo P-450 inducido por fenobarbital, a partir de la secuenciación nucleotídica de clones de DNA complementario. Dicho citocromo contiene 491 aminoácidos con un peso molecular de 55.900. La falta de completa identidad en la secuencia primaria entre dos formas de citocromo inducidos por fenobarbital, a pesar de ser inmunoidénticos, fue demostrada por Yuan y col.(234). Concluyeron que la microheterogeneidad de estas isoenzimas resulta, no de una modificación postranscripcional de una proteína precursora, sino que es producto de la expresión de genes diferentes. Atchison y Adesnik (235) determinaron que hay al menos seis genes, en el genoma de la rata, que codifican para citocromo P-450 inducible por fenobarbital y que, uno de ellos, tiene 12.000 pares de bases y contiene al menos 7 exones.

Los sucesos que conducen a un incremento de la transcripción de mRNA del citocromo P-450, luego de la administración de un xenobiótico, son desconocidos. Nebert y col.(236) han desarrollado la hipótesis del "locus Ah" para explicar los mecanismos de inducción del citocromo P-450 por 3-metilcolantreno y 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) en hígado de ratones. Este "locus Ah" es un rasgo hereditario dominante autosómico. Los autores sugieren que el sistema Ah comprende genes regulatorios, estructurales y temporales. Un receptor citosólico, producto del gen regulatorio, une el TCDD y el complejo formado interaccionaría con el DNA para aumentar la transcripción del mRNA del citocromo P-450 (237).

Con respecto al mecanismo por el cual el citocromo P-450 sintetizado se inserta en el retículo endoplásmico, se han realizado numerosos estudios. Ya ha sido demostrado que el lugar de síntesis del citocromo P-450 son los polisomas unidos a membrana (238). Hay cada vez más evidencias que indican que el citocromo P-450 sintetizado es directamente insertado, sin ser procesado, en la membrana del retículo endoplásmico (239, 240). Se postula que, además de la secuencia aminoterminal hidrofóbica que debe servir como señal para la inserción cotraduccional del citocromo en la membrana, el polipéptido contendría, una señal de detención de la transferencia (halt transfer signal), la cual interrumpe esa transferencia y deja una porción del citocromo expuesta en la superficie citoplasmática de la membrana (241).

### Inducción por drogas porfirinogénicas

Existe un grupo de drogas de características lipofílicas y no relacionadas estructuralmente, que estimulan la formación hepática de porfirinas en hígado de animales y en cultivo de hepatocitos. En ambos sistemas, estas drogas porfirinogénicas causan un aumento de la actividad de la enzima ALA-S, la enzima limitante de la velocidad de la síntesis del hemo (242). En este punto se tratará lo relacionado con el efecto de este tipo de drogas sobre el sistema de citocromo P-450. Las consecuencias de estos efectos sobre el camino metabólico del hemo, se verán en el capítulo de regulación.

El fenobarbital es una de estas drogas. El efecto sobre el citocromo P-450 ha sido ya ampliamente tratado en este mismo capítulo. Este bar-bitúrico produce un importante incremento en el citocromo P-450, causado por inducción de la síntesis de novo de la proteína, debido a un aumento del mRNA correspondiente (232). El fenobarbital induce un grupo de isoenzimas que son distintas de las inducidas por el 3-metilcolantreno (243). Sakai y col.(244) han aislado, de microsomas de hígado de ratas tratadas con fenobarbital, 3 isoenzimas inmunoidénticas, pero con pesos moleculares, puntos isoeléctricos y especificidad de sustrato distintos. Schultz y col.(245) han aislado una nueva familia de citocromo P-450 inducida por glucocorticoides, estructural y funcionalmente distintas a las inducidas por 3-metilcolantreno o fenobarbital.

Alilisopropilacetamida es un compuesto que tiene efectos opuestos sobre el citocromo P-450. Esta droga causa una rápida disminución del contenido de citocromo P-450, con una posterior inducción del mismo (246,247).

Diversos autores han demostrado que la disminución del citocromo P-450 por AIA se debe a la formación de un aducto con el hemo y la posterior degradación de éste, que conduce a la formación de unos pigmentos verdes (248). Estos pigmentos verdes provendrían de la alquilación del hemo, grupo prostético del citocromo P-450, obteniéndose N-alquilporfirinas. Como efecto tardío el AIA produce la inducción del citocromo P-450. Rifkind y col.(247) observaron que luego de 16 horas de la administración de AIA a embriones de pollo, se estimulaba el metabolismo, a través del citocromo P-450, de todos los sustratos utilizados; mientras que si se medía luego de sólo una hora de la administración de AIA, este metabolismo estaba inhibido. El AIA promueve una síntesis de novo del apocitocromo P-450 (249). Esta

inducción es a nivel transcripcional, dado que se demostró que su administración in ovo incrementaba 3 ó 4 veces el nivel de mRNA del citocromo P-450 (250).

Otra droga de similares características es el DDC, potente agente porfirinogénico en embriones de pollo y que provoca un incremento en la síntesis de citocromo P-450.

Recientemente, Brooker y col.(252), utilizando criterios inmunológicos y pruebas de hibridización, demostraron que el fenobarbital, AIA y DDC inducen el mismo mRNA del citocromo P-450, debido a la expresión aumentada del mismo gen. Además comprobaron que otras drogas, conocidas como inductoras de citocromo P-450, como 3-metilcolantreno, beta-naftoflavona o pregnenolona-16-alfa-carbonitrilo, no incrementaban el nivel de mRNA inducido por AIA, sino que, por el contrario, reducían su nivel a valores inferiores a los de controles no tratados. Estas observaciones podrían ser de gran importancia para la comprensión del mecanismo por el cual las drogas porfirinogénicas provocan los ataques de porfiria hepática aguda.

### CAPITULO 3: REGULACION E INDUCCION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO

La biosíntesis del hemo es un camino metabólico esencial para los organismos aeróbicos, por lo tanto, un bloqueo completo de su formación representaría, para estos, una lesión letal. La información recogida durante los últimos años indica que, el camino de la biosíntesis del hemo está regulado y modulado eficientemente de modo de proveer la cantidad de hemo requerida para la síntesis de varias hemoproteínas.

La organización subcelular y las múltiples etapas catalizadas enzimáticamente en la síntesis del hemo ofrecen numerosos puntos posibles para un control regulatorio.

Estos sitios potenciales de regulación serían, entre otros, los siguientes: a) cantidad y actividad de las enzimas involucradas en el camino metabólico; b) disponibilidad de los precursores e intermediarios; c) interrelación estructural de las enzimas del camino biosintético; d) pérdida de intermediarios por transferencia fuera de la célula o a través de caminos metabólicos alternativos.

De todos ellos es el primero, sin dudas, el más importante en la regulación de la biosíntesis del hemo siendo, también, el de mayor relevancia en la patogénesis de este camino metabólico.

#### REGULACION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-SINTETASA

El control regulatorio primario en la biosíntesis del hemo hepático es ejercido sobre la enzima ALA-S (28, 253). Este punto de control metabólico es lógico, no sólo por razones termodinámicas, sino porque esta enzima es la primera del camino biosintético y sus sustratos, glicina y succinil CoA, se encuentran en abundancia. Por otro lado, la actividad de ALA-S in vivo, es la más baja de todas las actividades de las enzimas de la biosíntesis del hemo, constituyendo la formación de ALA, la etapa limitante de la velocidad de síntesis de este camino metabólico (254). Otra característica importante de esta enzima es su rápida inducibilidad (94).

La actividad de ALA-S hepática está sujeta a un control de retroalimentación ("feedback") negativa ejercido por el producto final: el hemo. Este hecho fue descrito inicialmente en bacterias (84) y luego confirmado

en organismos superiores (254). Varios investigadores han desarrollado la hipótesis sobre la existencia de un pool regulatorio de hemo, el que sería responsable del control de retroalimentación negativa sobre ALA-S (255, 256).

Hay, al menos, tres sitios posibles donde el hemo ejercería el control regulatorio de su propia biosíntesis: a) inhibición de la actividad de ALA-S; b) represión de la síntesis de ALA-S a nivel transcripcional o traduccional; c) inhibición de la transferencia de ALA-S citosólica a mitocondrias.

#### -Inhibición de la actividad de ALA-S por hemo

La inhibición de la actividad de ALA-S por hemo fue observada sólo en preparaciones de enzima parcialmente purificadas y con concentraciones de hemo entre  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  M, siendo estas muy superiores respecto de las concentraciones suficientes para reprimir la síntesis de la enzima, que son entre  $10^{-8}$  y  $10^{-7}$  M (24, 31, 46).

Sin embargo, es posible que, debido a la yuxtaposición de la primera y la última enzimas de la biosíntesis del hemo en la mitocondria, concentraciones locales de hemo endógeno puedan ser suficientemente elevadas para ejercer un efecto inhibitorio sobre ALA-S. Wolfson y col.(257) examinaron esta posibilidad midiendo la actividad de ALA-S en mitocondrias intactas, aisladas de hígado de rata, mientras, simultáneamente, era generado hemo, vía ferroquelatasa, a diferentes velocidades. Con niveles de generación de hemo hasta 75 veces superiores a los que ocurren in vivo, no se observó inhibición de ALA-S, indicando que, este mecanismo de inhibición por producto, no es importante, fisiológicamente, en la regulación de la biosíntesis del hemo hepático.

Recientemente, Pirola y col.(258), trabajando en mitocondrias de hígado de embrión de pollo, concluyeron, en forma similar, que el hemo no actúa, in vivo, como inhibidor de la actividad de ALA-S.

#### -Represión de la síntesis de ALA-S

En 1966 Granick (28), realizando estudios en suspensiones de células hepáticas de embriones de pollo, demostró que la inducción de ALA-S por diversas sustancias requiere la síntesis de novo de la proteína enzimática. Dicha inducción era impedida por mitomicina C y actinomicina D, inhibidores de la transcripción, y por puomicina, inhibidor de la traducción. A la

vista de sus resultados, propuso un mecanismo general para la regulación e inducción de ALA-S, basado en el mecanismo de represión propuesto por Jacob y Monod (259). En el modelo de Granick, el hemo, producto final de la secuencia metabólica, se une a una proteína, el aporepresor, para formar una molécula de represor. Este actúa sobre el gen operador y bloquea la transcripción del gen estructural, impidiendo la formación del mRNA<sup>ALA-S</sup> y, por consiguiente, bloqueando la síntesis de novo de ALA-S.

Un inductor químico de ALA-S sería aquella sustancia con capacidad para competir con el hemo por un sitio en el aporepresor, impidiendo la formación del represor completo. Así se liberaría la síntesis de ALA-S. Varios investigadores confirmaron el efecto represor del hemo sobre ALA-S, pero aun no está aclarado el mecanismo preciso por el cual ocurre.

El control de la síntesis de ALA-S a nivel traduccional fue sugerido, en primer lugar, a través de estudios cinéticos realizados sobre el descenso de la actividad de ALA-S en células de hígado de embriones de pollo, luego de la adición de hemo o inhibidores de síntesis de proteínas (260, 261). Posteriormente, los estudios fueron extendidos a sistemas de mamíferos obteniéndose evidencias de la existencia del control por hemo a nivel traduccional (262). Más recientemente, Yamamoto y col.(263) demostraron que la traducción de mRNA<sup>ALA-S</sup> en un lisado de reticulocitos de conejo, era inhibida específicamente por el agregado de hemina. Sus estudios sugieren que el hemo inhibe en la etapa de elongación, interactuando con las cadenas del péptido naciente del ALA-S en los polisomas. Por otra parte Ades (264) demostró que el hemo bloquea la maduración del precursor de ALA-S inducido por AIA en hepatocitos de embriones de pollo.

Paralelamente a estos estudios, otros investigadores han sugerido que el hemo actuaría inhibiendo la transcripción e impidiendo la obtención del mRNA correspondiente a ALA-S. A esta conclusión arribó Whiting (38) a través de estudios con polisomas aislados de hígado de embriones de pollo. Del mismo modo, Srivastava y col.(265), en cultivo de células de embriones de pollo, sugirieron que el efecto represor primario de la hemina es a nivel transcripcional. Posteriormente, Yamamoto y col.(266), observaron que el hemo inhibía la síntesis de novo de mRNA de ALA-S, en hígado de ratas tratadas con AIA.

De acuerdo a estos resultados surge que el efecto represor de hemo sobre la enzima ALA-S es ejercido sobre ambos niveles: transcripción y traducción.

### -Inhibición de la transferencia citosol-mitocondria

Como ya fue mencionado anteriormente, la ALA-S es una enzima mitocondrial, pero su síntesis se realiza en poliribosomas citosólicos. Hayashi y col.(34) demostraron que ratas tratadas con AIA acumulan una considerable cantidad de ALA-S, no sólo en mitocondrias, sino también en citosol. Fue demostrado posteriormente que la ALA-S que aparece en la fracción citosólica, es un precursor de la enzima mitocondrial que es procesado postraduccionalmente (48). En un trabajo posterior, Hayashi y col.(267) demostraron que cuando se inyecta hemina a ratas tratadas con AIA, el nivel de ALA-S en citosol se incrementaba significativamente, mientras que decrecía el nivel de la enzima mitocondrial. Estos resultados indicaban que el hemo inhibía no sólo la inducción, sino la transferencia de ALA-S de citosol a mitocondria, lo que fue posteriormente confirmado por Yamauchi y col.(39). Debido a que la mitocondria es el sitio fisiológico de funcionamiento de la enzima, este sería otro modo de regular la síntesis del hemo. Más recientemente, en el mismo laboratorio, utilizando un sistema experimental in vitro de hígado de pollo, fue demostrado que tanto el transporte a mitocondria, como el procesamiento del precursor citosólico de ALA-S, es inhibido por concentraciones de hemina tan bajas como 3  $\mu\text{M}$  (268). Casi al mismo tiempo, Srivastava y col.(269) observaron el mismo efecto inhibitorio de hemina sobre la transferencia de pre-ALA-S en mitocondrias de hígado de embriones de pollo, descartando, además, que esto se debiera a un efecto tóxico general de la hemina sobre la importación de proteínas a mitocondrias.

La transferencia postraduccional, ya sea in vivo o in vitro, de la mayoría de las proteínas mitocondriales, dependen del estado energético de la mitocondria, requiriendo la existencia de un gradiente electroquímico sobre la membrana interna de dicha organela. Este potencial es disipado, y la transferencia inhibida, por desacoplantes, ionóforos o inhibidores del transporte electrónico (270, 271). Una posibilidad para explicar el efecto inhibitorio sobre la transferencia citosol-mitocondria, residiría en que el hemo interactuara específicamente con el precursor de la enzima, interfiriendo de este modo, con él o los componentes del sistema de transporte a mitocondria (268).



En vista de la regulación "feedback" de ALA-S por hemo, Granick y col.(256) postularon la existencia de un pool de hemo intracelular, específicamente involucrado en el control de ALA-S. De acuerdo a esta hipótesis, las sustancias inductoras de ALA-S serían aquellas capaces de disminuir el tamaño o alterar la cinética de este pool de hemo regulatorio. Su concentración y mecanismo de acción no está aun aclarado, aunque presumiblemente se localice en el citosol, debido a que es la ruta obligada del hemo sintetizado en mitocondrias al sitio de síntesis de ALA-S (272). Este pool regulatorio de hemo puede ser reducido de tres maneras: 1) por incremento de la utilización del hemo; 2) por aumento de su degradación; 3) por inhibición de su síntesis (61).

#### -Biosíntesis de hemo y la inducción de citocromo P-450

El hemo sintetizado en la célula hepática es utilizado para la síntesis de diversas hemoproteínas microsomales, mitocondriales y citosólicas. Dentro de éstas, el citocromo P-450, es la hemoproteína que requiere la mayor cantidad del hemo, cerca del 65% del total sintetizado (254). Además del hemo, el citocromo P-450 requiere la síntesis de su apoproteína. Actualmente no se sabe si ambos procesos sintéticos están o no coordinados. Este tipo de interdependencia ha sido demostrado en la formación de otras hemoproteínas como hemoglobina (273) y citocromo c (274). Sin embargo, estudios realizados sobre el papel del hemo en la formación de citocromo P-450, indican que la síntesis del hemo no es limitante de la inducción del citocromo P-450 mediada por drogas (275) y que puede haber acumulación del apocitocromo con inhibición parcial de la síntesis de hemo (276). De este modo, la síntesis de apocitocromo P-450 sería el evento primario y limitante de la velocidad que controla la inducción de citocromo P-450 mediada por drogas, y procede independientemente de la síntesis de hemo. Esta formación de apocitocromo provocaría la disminución del pool de hemo regulatorio y la consiguiente desrepresión de la síntesis de ALA-S. Es así que la inducción de ALA-S por drogas lipofílicas como el fenobarbital es una consecuencia de la inducción de apocitocromo P-450 (275).

Recientemente, Ravishankar y Padmanaban (277) han encontrado evidencias demostrando que, aunque el hemo y la apoproteína se renuevan independientemente, el grupo prostético protegería al apocitocromo de su degradación. Además demostraron que la inhibición de la síntesis de hemo bloquea la transcripción de los genes de citocromo P-450, sugiriendo que la expre-

sión de estos genes está gobernada, al menos, por dos parámetros (278). Uno de ellos es el hemo que actuaría como una molécula regulatoria general de la síntesis de todos los citocromos P-450; el otro parámetro es la droga inductora que regularía la especificidad del citocromo.

Un mecanismo distinto de inducción ha sido propuesto por Lim y col.(279). Estos investigadores señalaron que el sitio primario de la inducción de ALA-S, es la destrucción del grupo prostético del citocromo P-450 mediado por drogas, con la consiguiente disminución del hemo regulador.

Existe otro grupo de drogas, solubles en lípidos, que disminuyen el pool de hemo regulatorio, no por una mayor utilización como lo hace el fenobarbital, sino por causar una marcada degradación, como lo harían el AIA y DDC o por inhibición de su síntesis en alguna etapa del camino biosintético, tal es el efecto del DDC y griseofulvina. Estos compuestos incrementan la actividad de ALA-S, interfiriendo en el control "feedback" ejercido por el hemo, debido a la reducción del mencionado pool regulatorio (275).

Sinclair y col.(280) han demostrado la inducción de ALA-S por alcoholes de 3 a 5 C en cultivos de hepatocitos de embriones de pollo y que, esta inducción, se correlaciona directamente con la inducción del citocromo P-450. La hidrofobicidad de estas moléculas aumenta su efectividad, siendo estos alcoholes, además, las moléculas más simples reportadas como inductoras de ALA-S y citocromo P-450.

#### -Biosíntesis de hemo y triptofano pirrolasa

La triptofano pirrolasa es una enzima citosólica hepática que utiliza el hemo como grupo prostético y que cataliza la ruptura oxidativa del anillo pirrólico del triptofano para producir formilkinurenina, primer paso en la degradación del triptofano.

Badawy y col. han presentado evidencias que sugieren que esta enzima es un marcador sensible a los cambios en la concentración hepática de hemo, dado que el grado de saturación de la triptofano pirrolasa varía considerablemente en diversas condiciones (272): aumenta significativamente después de una inyección de hemina y decrece después de la administración de AIA y DDC (281). Pese a que la triptofano pirrolasa requiere sólo el 1,4% (272) del hemo hepático, este grupo de investigadores sugirió la importancia de esta enzima en la regulación del metabolismo del hemo. Postu-

laron también que el grupo prostético del citocromo P-450, no proviene del pool de hemo regulatorio, lo que minimiza el papel de esta hemoproteína en la regulación del hemo (282). Dicho pool regulatorio estaría estrechamente asociado a la triptofano pirrolasa.

El aumento de ALA-S por drogas inductoras es explicado, de acuerdo a esta hipótesis, por la habilidad de estas sustancias para degradar el grupo prostético hémico de la triptofano pirrolasa, conduciendo a un aumento de la síntesis de la apoproteína y la utilización del pool de hemo regulatorio con la consiguiente liberación de la síntesis de ALA-S (283, 284).

#### AMPc EN LA REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO

A partir de los estudios de Wicks sobre la tirosina alfa-cetoglutarato transaminasa de hígado de rata (285), han sido presentados numerosos ejemplos de la regulación de la síntesis de proteínas específicas de eucariotes por AMPc. Entre otras, las síntesis de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (286), tirosina aminotransferasa (287), fosfatasa alcalina (288) y lactato deshidrogenasa-5-isoenzima (289) se ven aumentadas por la administración de AMPc o su derivado sintético dibutirillico.

A pesar de estos estudios, el mecanismo involucrado en este proceso no se ha aclarado todavía. Las observaciones preliminares, realizadas con la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, la que es inducida por AMPc aun en presencia de agentes como la actinomicina D, inhibidor de la síntesis de RNA, sostuvieron la hipótesis que el AMPc induce la síntesis de proteínas específicas por aumento de la traducción de una cantidad fija de mRNA (290).

Sin embargo, recientes estudios de la actividad de mRNA, usando sistemas de traducción in vitro, han provocado una completa reevaluación del papel del AMPc en la síntesis de proteínas. Estos resultados muestran que las actividades de los mRNA que codifican para fosfoenolpiruvato carboxiquinasa y tirosina aminotransferasa, entre otras, son incrementadas por AMPc en la misma proporción en que aumenta la síntesis de estas proteínas específicas (287, 291).

Estas observaciones excluyen la posibilidad que la traducción sea el sitio primario de la acción del AMPc, sugiriendo por el contrario, que este nucleótido aumentaría la actividad del mRNA promoviendo su síntesis o

procesamiento (286).

También han sido estudiados los efectos del AMPc sobre la enzima ALA-S, principal punto de regulación de la biosíntesis del hemo. Sin embargo, los resultados registrados en la literatura son contradictorios, ya que varían desde la ausencia total de efecto hasta acciones activadoras o inhibitoras.

Kim y Kikuchi (292, 293), estudiaron el efecto, in vivo, del AMPc y del dibutiril AMPc sobre ALA-S de hígado de rata inducida por AIA, encontrando una disminución de ALA-S mitocondrial y total por administración de estos nucleótidos cíclicos. Estos autores sugirieron que el AMPc ejercería sus efectos no solo inhibiendo la síntesis de novo de ALA-S, sino también, impidiendo la transferencia de la forma citosólica a mitocondrias, ya sea por inhibición del transporte o de la maduración. De este modo, niveles intrahepáticos de AMPc podrían regular la síntesis de hemo de un modo similar a éste (294).

Bonkowsky y col.(295) en hígado de rata, al igual que Sassa y Kappas (296) en cultivos de hepatocitos de embriones de pollo, no pudieron encontrar ningún efecto del AMPc sobre ALA-S.

Trabajando con suspensiones de hepatocitos de rata y hepatocitos de embriones de pollo, Edwards y Elliot (297) y Srivastava y col.(298) respectivamente, demostraron que, si bien el AMPc no modificaba los niveles basales de ALA-S, era necesario para que se manifestara la inducción de esta enzima por AIA o DDC. Así el AMPc ejercería un efecto permisivo de la inducción de ALA-S.

Giger y Meyer (299), en cultivos de hepatocitos de embriones de pollo, encontraron un efecto potenciador del dibutiril AMPc sobre la inducción de ALA-S por fenobarbital. Contrariamente a estos resultados, Friedland y Ades (300), no observaron un efecto directo de AMPc sobre la regulación de la producción de ALA-S, en cultivos de células hepáticas de embriones de pollo. En este mismo sistema, Stephens y col.(301), han estudiado el efecto de agentes moduladores de los niveles intracelulares de AMPc, como adrenalina, teofilina, fluoruro de sodio, aloxano, etc. Sus resultados indicaron que, aquellas sustancias que elevaban los niveles de AMPc intracelular, aumentaban la inducción de ALA-S por AIA, mientras que ésta disminuía con aquellas sustancias capaces de disminuir los niveles del nucleótido cíclico. Estos resultados no han podido ser extrapolados a hepatocitos de rata debido a la no coincidencia de distintas observaciones (302).

De este modo el papel del AMPc sobre la regulación de la biosíntesis del hemo permanece aun desconocido.

### HORMONAS EN LA REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO

#### -Insulina y Glucagon

El papel de estas hormonas peptídicas en la regulación de la biosíntesis del hemo ha sido ampliamente estudiado aunque, al igual que en el caso del AMPc, los resultados presentados son contradictorios.

Granick y col.(256) informaron que la insulina, en concentraciones fisiológicas, causa un incremento en la biosíntesis de porfirinas, inducida por AIA, en hepatocitos de embriones de pollo. Similares resultados fueron obtenidos por Sassa y Kappas (296).

Por otra parte, Kim y Kikuchi (293) y Yamamoto y col.(294) encontraron que la inducción de ALA-S por AIA era significativamente reducida en hígado de rata cuando glucagon o insulina eran administradas junto con el inductor. Sin embargo, no había cambios apreciables en la magnitud de la inducción, cuando estas hormonas se inyectaban 2 horas después del AIA. Dichos autores sugirieron que, insulina y glucagon, mediarían sus efectos a través del aumento del pool regulatorio de hemo hepático por inhibición de la hemo oxigenasa. Coincidentemente, DeLoskey y Beattie (303) afirmaron que la insulina inhibiría la traslocación de ALA-S de citosol a mitocondria. Esto se debería a un efecto de la insulina que aumentaría el nivel de hemo intracelular y, por lo tanto, el contenido del pool de hemo regulatorio.

De acuerdo a los resultados de Stephens y col.(301), el glucagon aumentó significativamente la síntesis de porfirinas inducida por AIA en células de hígado de embriones de pollo. En el mismo sistema, Giger y Meyer (299) encontraron que el glucagon potenciaba la inducción de ALA-S y citocromo P-450 provocada por fenobarbital, mientras que la insulina reducía la inducción del citocromo P-450 sin alterar la de ALA-S.

Pilkis y col.(304) han estudiado exhaustivamente el control hormonal de los niveles de AMPc en hepatocitos de rata. En sus trabajos ha quedado bien aclarado que el glucagon estimula la adenilato ciclasa hepática, aumentando los niveles intracelulares de AMPc. Además la insulina antagoniza el incremento de AMPc causado por el glucagon, aunque aun no está aclarado en que sitio actúa. Es así que, cuando la relación de concentraciones

intracelulares insulina/glucagon es elevada, los niveles de AMPc hepáticos están deprimidos, y son aumentados cuando dicho cociente disminuye (305).

De acuerdo a esto, Edwards y Elliot (297) y Marks y col.(306) han sugerido que el efecto de estas hormonas peptídicas sobre la biosíntesis del hemo, dependería de la relación en la que se encuentran dentro de la célula y se ejercería a través del AMPc. Valores de insulina/glucagon hasta 4 ó 5, donde la concentración de AMPc es elevada, se traduciría en una mayor inducción de la síntesis de hemo; mientras que, cuando los valores de dicho cociente son mayores de 16 lo cual corresponde a niveles bajos de AMPc, la inducción estaría considerablemente deprimida.

Por otra parte, Giger y Meyer (299), coinciden en la mediación por AMPc de los efectos estimulatorios de glucagon, pero sugieren que la insulina no procedería a través de la disminución de los niveles de ese nucleótido cíclico.

#### -Hormonas esteroides

Las hormonas esteroides son otro de los factores fisiológicos que influyen la actividad de ALA-S hepática y, por lo tanto, la síntesis del hemo. Granick y Kappas (307) describieron un gran número de sustancias naturales que producen un aumento en la síntesis de porfirinas a través de la inducción de ALA-S en hepatocitos de embriones de pollo. Estas sustancias, esteroides reducidos en C-19 y C-21, incluyen metabolitos derivados de la biotransformación de hormonas gonadales y adrenocorticales y de intermedios en la síntesis de ácidos biliares.

En cultivos de hepatocitos de pollo fue demostrado que los esteroides de conformación 5 beta-H (anillos A y B en posición cis) son inductores más potentes que los 5 alfa-H (anillos A y B en posición trans)(307). Goldberg y col.(308) demostraron posteriormente que, en pacientes que sufrían ataques de porfirias agudas, se encontraban altas concentraciones de 5 beta-H esteroides, pero no en los casos de latencia (309). También fue demostrada una deficiencia en la actividad de la enzima delta(4)-5 alfa-reductasa en el hígado de aquellos pacientes (310). Sobre la base de estos resultados, fue sugerido que, la porfiria hepática podría estar asociada a una anomalía en el metabolismo de los esteroides, que llevaba a una relación 5 beta/5 alfa esteroides elevada. Kappas y col.(311) demostraron que otras drogas porfirinogénicas, como los barbitúricos, producían un aumento del cociente 5 beta/5 alfa esteroides por depresión de la actividad de la

delta(4)-5 alfa-reductasa.

Más recientemente, Anderson y col.(312), han demostrado la inducción de ALA-S y citocromo P-450 por esteroides, siendo los más potentes la progesterona y sus 5 beta-H metabolitos, así como los metabolitos 5 beta-H de los andrógenos. La aparición de estos esteroides, sería la clave de la exacerbación de las porfirias hepáticas hereditarias luego de la pubertad.

Contrariamente a esos resultados, Edwards y Elliot (313), informaron que para una gran variedad de androstano y pregnano derivados, la inducción de ALA-S por esteroides 5 alfa-H era al menos tan grande como la causada por los 5 beta-H derivados, en hepatocitos de rata. En forma similar, Marks y col.(306), en hepatocitos de embriones de pollo, no encontraron ningún requerimiento estérico específico, para la inducción de ALA-S por esteroides. Sus resultados sugieren además, que la disminución de la delta(4)-5 alfa-reductasa que lleva a una acumulación de 5 beta-H esteroides en pacientes con porfiria hepática aguda, no está relacionada con la patogénesis de esta enfermedad.

Un segundo tipo de efecto hormonal, ha sido descrito en ratas adrenalectomizadas y en hígado perfundido. En estos sistemas, no se observó inducción de ALA-S mediada por drogas, a menos que se administraran junto con cortisol, lo cual no era necesario en suspensiones de hepatocitos. Estas observaciones sugieren un rol permisivo de los esteroides o de sus metabolitos para la inducción de ALA-S in vivo (313, 314).

#### CONTROL POR GLUCOSA DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO

En 1963, Granick y Urata (27), describieron la inducibilidad de la actividad de la enzima ALA-S, en hígado de embriones de pollo, por la administración de DDC. Poco tiempo después, Tschudy y col.(315) demostraron que la inducción de esta enzima en el hígado de mamíferos podía ser prevenida por una ingestión elevada de glucosa o de una dieta rica en hidratos de carbono. Otra observación importante fue que la inducción de ALA-S por administración de AIA u otros compuestos porfirinogénicos, era mayor en animales ayunados que en los no ayunados. Este fenómeno fue denominado "efecto glucosa", por su similitud con lo que ya había sido observado en microorganismos.

En bacterias, la glucosa ejerce tres clases de efectos inhibito-

rios: a) represión catabólica; b) represión transiente; c) exclusión del inductor (316). Los mecanismos moleculares responsables de estos efectos de la glucosa no están aun completamente dilucidados, pero se sabe que en los dos primeros actúa sobre la expresión génica, afectando una etapa temprana de la transcripción, mientras que en el tercero actuaría sobre la permeabilidad de la bacteria a inductores específicos.

Makman y Sutherland (317) demostraron que la adición de glucosa a cultivos de bacterias, conducía a un descenso en los niveles intracelulares de AMPc. Posteriores estudios genéticos e in vitro de varios operones catabólicos, llevaron al descubrimiento de un control positivo de la expresión génica ejercido por el AMPc a través de un factor proteico conocido como CAP (catabolite activator protein), CRP (cAMP receptor protein) o CGA (catabolite gene activator protein)(318). La idea aceptada de este mecanismo de control, es que el complejo AMPc-CAP interactúa con un promotor específico catabolito-sensible y estimula la transcripción del operón correspondiente.

El efecto represor de la glucosa sobre la expresión de los genes catabólicos está directamente relacionado con el descenso de los niveles de AMPc dentro de la célula bacteriana (319). Sin embargo, en los últimos años, diferentes grupos de investigadores han acumulado evidencias sugiriendo que el AMPc no sería el regulador exclusivo de la represión catabólica (316).

También en mamíferos ha sido observado que varias enzimas son reprimidas por administración de glucosa. Entre ellas, ornitina-S-transaminasa y treonina deshidrasa (320), tirosina aminotransferasa (287) y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (GTP)(321).

La acción de la glucosa podría involucrar la inhibición de la secreción de glucagón lo que conduciría a un descenso de los niveles hepáticos de AMPc (322). Beale y col.(321) demostraron que la glucosa inhibe la síntesis de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa de hígado de rata por disminución de la cantidad de mRNA, presumiblemente afectando alguna etapa en la generación del mRNA traduccionalmente activo.

A partir de estas observaciones diversos investigadores han estudiado este "efecto glucosa" sobre el metabolismo del hemo. Hickman y col.(323) informaron que la inducción de ALA-S por AIA, en hígado de rata, podía ser inhibida por glucosa y otros azúcares metabolizables, sugiriendo que la acción de la glucosa se ejercería a nivel del RNA.



Bonkowsky y col.(295) concluyeron de sus resultados que el efecto glucosa se debería a una represión de ALA-S mediada por dicho glúcido o por la glucosa-6-P. Kim y Kikuchi (293) observaron que la glucosa disminuye los niveles de ALA-S inducida por AIA en citoplasma y en mitocondrias, sugiriendo que, al igual que el hemo, la glucosa interfiere no sólo la inducción enzimática, sino también la conversión de la enzima citosólica a mitocondrial.

Más recientemente, el efecto glucosa fue demostrado en suspensiones y cultivos de hepatocitos de rata y de embriones de pollo. Scott y Edwards (324) informaron que la inducción de ALA-S por AIA era bloqueada por el agregado de glucosa a hepatocitos de rata y este efecto podía ser revertido por agregado de AMPc. De este modo sugirieron que, el efecto glucosa, podría estar mediado por una disminución de los niveles intrahepáticos de AMPc.

Varios autores no han podido observar un efecto inhibitorio de glucosa in vitro (297, 325). Según ellos, esto sería debido al hecho que la glucosa no actuaría directamente sobre la célula hepática, sino que lo haría modulando la relación insulina/glucagon en plasma, afectando de este modo los niveles de AMPc (326).

Sin embargo, Giger y Meyer (299) observaron que la adición de glucosa a cultivos de hepatocitos de embriones de pollo, provocaba una disminución de la inducción de ALA-S y citocromo P-450 mediada por fenobarbital, en ausencia de factores extrahepáticos como suero u hormonas. Similares resultados fueron obtenidos por Schoenfeld y col.(327). Dichos autores, recientemente han demostrado que la inducción de ALA-S por AIA, en hepatocitos de embriones de pollo, puede ser bloqueada también por determinados aminoácidos, debido a sus propiedades gluconeogénicas. La glucosa 6-fosfato o un metabolito de este, que no interviene en el camino glucolítico, sería el agente activo que conduce al "efecto glucosa" (328).

Badawy y col.(283) sugirieron que la glucosa bloquea la inducción de ALA-S por AIA en ratas, por un mecanismo que previene la destrucción del pool de hemo regulatorio, que causara la droga porfirinogénica. Dichos autores presentaron evidencias, además, de un efecto glucosa sobre ALA-S no inducida, lo que no ha sido observado por ninguno de los investigadores citados.

Poulson y Polglase (329) estudiaron el efecto de la glucosa sobre la biosíntesis del hemo en eucariontes inferiores como la levadura

*S.cerevisiae*. Encontraron acumulación de protoporfirinógeno IX en aquellas células tratadas con glucosa, concluyendo que el sitio de represión de la glucosa sería la protoporfirinógeno oxidasa. Este efecto de la glucosa pudo ser revertido por la adición de AMPc.

### EFFECTO DE METALES SOBRE LA BIOSINTESIS DEL HEMO

Ha sido demostrado que los metales tienen un papel importante en ciertas etapas de la biosíntesis del hemo, siendo potencialmente activos en la regulación de este metabolismo (330).

#### -Plomo

Los principales efectos bioquímicos del plomo sobre el organismo pueden ser agrupados en 3 clases. En primer lugar, sus efectos sobre el metabolismo del hemo; en segundo lugar, el plomo divalente es similar en algunos aspectos al ión calcio y su acción competitiva con este ión afecta, entre otros, la respiración mitocondrial y diversas funciones neurológicas. Por último, el plomo posee efectos sobre el DNA y RNA, que le confieren características de teratogénico, mutagénico y cancerígeno (331).

La influencia del plomo sobre la biosíntesis del hemo se debe, principalmente, a la alta afinidad de este metal por grupos SH, lo que da como resultado, la inhibición de varias enzimas SH-dependientes, entre las que se encuentra ALA-D y ferroquelatasa (331). Esto conduce a la acumulación de ALA, el cual es excretado en exceso en orina, y de protoporfirina IX, en la médula ósea, principalmente.

Los efectos del plomo sobre otras enzimas de la biosíntesis del hemo están menos documentados. La actividad de coproporfirinógeno oxidasa se encuentra deprimida, con la consecuente acumulación de coproporfirina (332). En el caso de ALA-S, los resultados presentados en la literatura son contradictorios y varían según las diferentes especies. Whiting y Granick (45), encontraron que el plomo inhibía ALA-S de hígado de embriones de pollo, mientras que Strand y col.(260), observaron un incremento de ALA-S que era suprimido por cicloheximida. Maxwell y Meyer (276), encontraron que la administración de plomo a ratas, causaba un aumento de la actividad de ALA-S en hígado, dependiente de la síntesis de proteínas. Más recientemente Pirola y col.(333) observaron similares resultados en mitocondrias de hígado

de embriones de pollo.

Estos diferentes efectos del plomo sobre la actividad de ALA-S, parecen ser específicos de especie y de órgano. La enzima ALA-S de eritrocitos no es afectada por el plomo in vivo, pero en hepatocitos es estimulada por este metal. Esta estimulación puede ser debida a la disminución del efecto represor del hemo por el bloqueo causado por el plomo sobre la última etapa de su síntesis. In vitro la ALA-S es inhibida por el plomo (331).

También han sido presentados resultados contradictorios sobre el efecto del plomo sobre la enzima PBGasa. La enzima proveniente de eritrocitos es inhibida in vitro por plomo, mientras que no tiene efecto sobre la PBGasa de hígado. Por otra parte no ha sido detectada disminución de actividad de PBGasa en glóbulos rojos de pacientes intoxicados con plomo (331).

Diversos autores han demostrado un descenso en la actividad metabolizante del citocromo P-450 producido por el plomo (334). Ha sido sugerido que el plomo disminuiría el contenido de citocromo P-450 por su efecto inhibitorio sobre la síntesis del hemo (335). Si este fuera el único modo de actuar del plomo, tal situación implicaría una paralización total de la síntesis del hemo para explicar el descenso en la actividad de esta hemoproteína, lo cual no ocurre. Por lo tanto se han sugerido otros puntos sobre los cuales el plomo ejercería sus efectos como ser, el aumento de hemo oxigenasa y la inhibición directa del plomo sobre grupos SH necesarios para el transporte de electrones por el citocromo P-450 (336).

#### -Hierro

El hierro posee numerosos efectos sobre la síntesis y degradación del hemo. Stein y col.(337) demostraron que la administración de hierro a ratas producía un aumento de la actividad de ALA-S debido, posiblemente, a un incremento de la síntesis de mRNA. También demostraron que el hierro potenciaba la inducción de ALA-S mediada por drogas, por un mecanismo quizás no relacionado con el pool de hemo regulatorio (338). Kushner y col.(339) demostraron la inhibición de URO-D por hierro en extractos citoplasmáticos de hígado de cerdo.

Estos estudios son relevantes con respecto a la patogénesis de la porfiria cutánea tarda, dado que en esta enfermedad, hay un exceso de hierro y una sobreproducción de porfirinas conteniendo de 5 a 8 grupos carboxilo. Es así, que la actividad de URO-D ha sido encontrada disminuída en pacientes con porfiria cutánea tarda.

Otro sitio importante de acción del hierro sobre el metabolismo del hemo resulta de la estimulación de la peroxidación de lípidos causado por el metal. Ha sido demostrado que el hierro estimula la peroxidación microsomal de lípidos dependiente de NADPH y que esta es acompañada de una pérdida de hemo y citocromo P-450, debido posiblemente a la acción de una peroxidasa lipídica (340).

Maines y Kappas (336) han demostrado que el hierro y otros metales producen un incremento en la actividad de hemo oxigenasa hepática, lo que conduciría, también, a un aumento de la degradación del hemo.

#### -Cobalto

De Matteis y Gibbs (341) demostraron que la administración de cloruro de cobalto(II) a ratas, producía la inhibición de la síntesis de hemo e incremento en su degradación. La inhibición de la síntesis del hemo in vivo ocurre en dos sitios: 1) la síntesis de ALA y 2) la conversión de ALA en hemo. El primer efecto es debido a la inhibición de la actividad de ALA-S más que a una represión de la síntesis enzimática. El segundo efecto se debería a la formación de cobalto-protoporfirina.

Así mismo, la degradación del hemo se ve grandemente incrementada por efecto del cobalto a causa de la estimulación de la síntesis de hemo oxigenasa (336, 342).

Estudios realizados en cultivos de hepatocitos de rata y en animales enteros han demostrado que el cobalto interfiere en la formación del citocromo P-450. Si bien Tephly y col.(343) explicaron este hecho por la inhibición producida sobre la síntesis del hemo, Guzelian y Bissel (344) sugirieron que se debe al bloqueo de la asociación del hemo con el apocitocromo.

Las mayores controversias sobre el efecto del cobalto(II) en el metabolismo del hemo, se refieren al modo en que dicho metal ejerce sus efectos. Ciertos autores sugieren que el cobalto actúa directamente como ión metálico (342), mientras que otros sostienen que lo hace a través de su asociación con protoporfirina IX (341, 345).

#### -Otros metales

Han sido realizadas una gran cantidad de observaciones sobre los efectos de distintos metales, además de los ya mencionados, sobre el metabolismo del hemo. Los iones metálicos Cu(II), Mn(II), Fe(III), Ni(II), Cr(II) Zn(II), Cd(II) y Hg(II) producen, principalmente, la inducción de la hemo oxigenasa, conduciendo a una depleción del hemo microsomal y por la tanto del citocromo P-450 (336). Estos resultados indicarían que los metales pueden regular directamente el metabolismo del hemo celular.

## CAPITULO 4: LAS PORFIRIAS

Las porfirias son un grupo de enfermedades metabólicas, de origen hereditario, caracterizadas por una sobreproducción y excreción aumentada de precursores del hemo. Para la clasificación de las porfirias se toman en cuenta 3 características. En primer lugar, el principal sitio de síntesis de porfirinas afectado; luego, si la enfermedad presenta características agudas y, por último, el tipo de excreción de porfirinas y precursores en orina y heces (346, 347).

### Clasificación de las Porfirias

1) <u>Hepáticas</u>		
Porfiria aguda intermitente		
Coproporfiria Hereditaria		<u>Porfirias agudas</u>
Porfiria variegata		
Porfiria cutánea tarda		
-genética		
-tóxica		
-neoplásica		
		<u>Porfirias no agudas</u>
2) <u>Eritropoyéticas</u>		
Porfiria congénita		
Protoporfiria eritropoyética		

En los últimos quince años ha sido demostrado que cada uno de los tipos de porfiria, resulta de una deficiencia parcial de una de las enzimas de la biosíntesis del hemo (348, 349). Estos defectos no conducen a una deficiencia en el contenido de hemo, excepto probablemente en el hígado durante ataques de porfiria aguda, debido a que son compensados por un incremento en la concentración intracelular del sustrato de la enzima defectiva, lo cual es suficiente para restaurar la velocidad normal de la síntesis de hemo. Este incremento es causado por la inducción de ALA-S, enzima que controla la velocidad de este camino metabólico y sujeto a control de realimentación negativa por el hemo. Este hecho es el que produce el "pattern" distintivo de acumulación y excreción de porfirinas y sus precursores, que

caracteriza cada uno de los tipos de porfiria y sus manifestaciones clínicas (350).

Sin embargo, las deficiencias enzimáticas no siempre llevan a una acumulación de sustrato detectable. Esto es verdad tanto para tejidos como para individuos. También es importante señalar las grandes diferencias que se producen en respuesta al mismo defecto enzimático entre diferentes individuos. La porfiria en latencia es mucho más común que la manifestación de la enfermedad en cualquier tipo de porfiria. Una gran proporción de portadores del defecto genético, probablemente cerca del 40% en la porfiria cutánea, no presentan anomalías bioquímicas detectables, a excepción de la actividad enzimática disminuida. Algunos de los factores que, al menos en parte, determinan estas diferencias han sido identificados y son, por ejemplo, el consumo de barbitúricos y otras drogas como el hexaclorobenceno, el alcohol, el hierro, cambios hormonales, etc., aunque aun no han sido aclarados completamente, los mecanismos por los cuales conducen a la manifestación clínica de esos defectos genéticos (347, 351).

<u>PORFIRIA</u>	<u>RASGO HEREDITARIO</u>	<u>DEFECTO ENZIMATICO</u>	<u>EXPRESION</u>
Porfiria congénita	Autosomal recesivo	PBGasa y/o URO-III cosintetasa	Eritrocitos
Porfiria aguda intermitente	Autosomal dominante	PBGasa	Hígado
Coproporfiria hereditaria	Autosomal dominante	Coproporfirinógeno	Hígado
Porfiria variegata	Autosomal dominante	Protoporf.oxidasa o ferroquelatasa	Hígado
Porfiria cutánea	Autosomal dominante	URO-decarboxilasa	Hígado
Porfiria tóxica	Adquirida	Variable	Hígado
Protoporfiria eritropoyética	Autosomal dominante	Ferroquelatasa	Eritrocitos e Hígado

## PORFIRIAS AGUDAS

Las porfirias agudas son enfermedades hereditarias transmitidas como caracteres autosómicos dominantes. Todas tienen en común la precipitación de ataques agudos provocados por un gran número de factores, especialmente diversas drogas. Estos ataques agudos son también desatados por cambios en los niveles de esteroides, como los que ocurren en el pasaje a la pubertad o durante el período menstrual (352).

Estas enfermedades tienen tres fases: de latencia, de remisión y del ataque agudo. La fase de latencia está bioquímicamente compensada, de modo que se excrete una cantidad elevada, pero no excesiva, de precursores de porfirinas. Los ataques de porfiria aguda se presentan con dolores abdominales, disturbios neuropsiquiátricos, disfunciones autonómicas y excreción urinaria manifiestamente elevada de precursores (61, 346).

### -Porfiria aguda intermitente (PAI)

En esta enfermedad fue identificada una deficiencia de PBGasa (353), lo que conduce a una excesiva concentración de uroporfirina III y excreción urinaria de ALA y PBG. La actividad de dicha enzima está disminuida en un 50%, respecto de los valores normales, en hígado y eritrocitos.

El gen estructural de la PBGasa está situado en un solo locus sobre el cromosoma 11 (354). La PAI es heredada en forma autosómica dominante. Esta característica y el grado de descenso de las actividades enzimáticas, sugieren la presencia de un gen mutante, que no se expresa como enzima activa, alelo al gen normal en este locus. La baja, pero cualitativamente normal, actividad de PBGasa, representa entonces la expresión del alelo normal (355). A nivel molecular puede observarse heterogeneidad genética con al menos dos diferentes tipos de mutaciones productoras del defecto enzimático (356). En todos los casos estudiados la actividad de ALA-S está elevada (346).

### -Coproporfiria hereditaria (CH)

En esta forma de porfiria ha sido observada una excesiva excreción de coproporfirina III, lo que ha sido asociado con la actividad disminuida de coproporfirinógeno oxidasa en hígado y otros tejidos (357). Esta enfermedad es autosómica dominante y se caracteriza por una disminución de la



enzima mitocondrial mencionada. En este caso la actividad de ALA-S se observa siempre incrementada (346).

#### -Porfiria variegata (PV)

Es esta también una enfermedad autosomal dominante, la cual comparte junto con las 2 anteriores, las manifestaciones clínicas de ataques agudos de porfiria y caracterizadas por el descenso del 50% de la actividad de una de las enzimas, en este caso, localizada en mitocondrias (351). Ha sido sugerido que la actividad de ferroquelatasa está deprimida en esta enfermedad (358) aunque no ha sido aun confirmado. Otros investigadores han sugerido que la anomalía estaría ligada a una deficiencia de la protoporfirinógeno oxidasa (359). Nuevamente en este tipo de porfiria se encuentran elevados los niveles de ALA-S (346).

### PORFIRIAS NO AGUDAS

El grupo de las porfirias no agudas es más heterogéneo en sus características. Si bien es evidente que hay un componente hereditario en porfiria cutánea tarda, esta enfermedad es generalmente adquirida a través del abuso del alcohol o de ciertas drogas. Protoporfiria eritropoyética y porfiria congénita son netamente hereditarias. Las tres enfermedades se presentan generalmente con fotosensibilidad en la piel que lleva, en las dos últimas, a lesiones severas y desfiguración (61, 346).

#### -Porfiria cutánea tarda (PCT)

Es esta la más común de las porfirias. Los principales productos de excreción en esta enfermedad son: uroporfirina y porfirina heptacarboxílica, generalmente de la serie III.

La anomalía bioquímica fundamental en todos los pacientes es, indudablemente, una disminución en la actividad de URO-D hepática (360). Esta característica sería también un prerequisite para el desarrollo de PCT en respuesta a factores externos tales como alcohol y siderosis. Sin embargo, de acuerdo a mediciones de URO-D en eritrocitos y otros tejidos extrahepáticos, los pacientes con este defecto metabólico pueden ser divididos en dos grupos (361). En un grupo, la actividad enzimática extrahepática está disminuida en un 50%. Este defecto es heredado como una característica au-

tosómica dominante y los pacientes con este tipo de PCT, conocida como PCT familiar, pueden presentar manifestaciones clínicas a cualquier edad (362). En el otro grupo, la actividad enzimática de URO-D extrahepática es normal. Casi todos los pacientes en este grupo son adultos sin evidencias de PCT en otros miembros de la familia y ha sido descripta como PCT esporádica (361, 363). Dentro de este último grupo se incluye, también, aquella forma de PCT que puede surgir luego de la exposición a tóxicos químicos (PCT adquirida), tales como 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (364) y hexaclorobenceno (365) los cuales inhiben URO-D en hígado pero no en eritrocitos. Ha sido demostrado que este último tóxico produce un incremento en la actividad de ALA-S hepática, la cual se encuentra elevada en los pacientes con PCT (346).

El hierro hepático juega un papel preponderante en la expresión de las lesiones metabólicas inherentes a la PCT, como es la defectuosa decarboxilación de los porfirinógenos debido a la inhibición de URO-D. El metal interactuaría con residuos cisteínicos del sitio activo de la enzima reduciendo la afinidad por el sustrato (366, 367). Mukerji y col. (368) demostraron que la enzima URO-D de pacientes con PCT tiene un Km mayor para el uroporfirinógeno III que el de la enzima de sujetos normales y que aquella es más susceptible a la inhibición por hierro que la de éstos últimos.

#### -Protoporfiria eritropoyética (PE)

Esta enfermedad hereditaria autosómica dominante presenta como principal característica la fotosensibilidad solar debida a la excesiva concentración de protoporfirina circulante. Esto es debido a que la actividad de ferroquelatasa, última enzima del camino metabólico del hemo, está disminuída hasta cerca de un 15% del valor normal en todos los tejidos examinados (369, 370). Esta inesperadamente baja actividad enzimática, para un defecto autosomal dominante, no ha sido aun aclarada, aunque se ha sugerido que los valores obtenidos no reflejarían, fielmente, la actividad in vivo (370). También en esta porfiria se observan valores aumentados de ALA-S (346).

#### -Porfiria congénita (PC)

La porfiria eritropoyética congénita, conocida también como enfermedad de Günther, es una enfermedad hereditaria con característica autosómica recesiva. Las porfirinas excretadas en orina son uroporfirina y en me-

nor cantidad coproporfirina, pero ambos de la serie isomérica I. Esto sugirió que la deficiencia se produciría en la actividad de la uroporfirinógeno III-cosintetasa (371). Actualmente hay fuertes evidencias que indican que los pacientes con porfiria congénita son homocigotas para una mutación en un gen estructural que disminuye la actividad de Uroporfirinógeno III-cosintetasa en todos los tejidos y conduce a la sobreproducción, en eritrocitos, de porfirinas de la serie I (372).

Como en las otras porfirias, la actividad de ALA-S se encuentra elevada en pacientes con porfiria eritropoyética congénita (346).

### PORFIRIA TOXICA Y EXPERIMENTAL

A partir de observaciones clínicas en pacientes que eran medicados con un sedativo conocido como Sulfonal se tuvo conocimiento de la posibilidad de inducir un estado porfírico, en forma experimental, en animales de laboratorio. Entre un 7 a 10% de pacientes administrados con este tranquilizante desarrollaban síntomas de porfiria aguda (373). Esta alta frecuencia de toxicidad sugiere que el Sulfonal es directamente responsable de las manifestaciones de porfiria y no sólo precipita ataques agudos en sujetos genéticamente predispuestos.

En los últimos años se ha demostrado que una gran cantidad de sustancias químicas no relacionadas estructuralmente, producen porfiria de algún tipo en animales de laboratorio (374). Estas sustancias pueden ser divididas en cuatro grandes grupos, siendo representativos de cada uno de ellos, el AIA, el DDC, la griseofulvina (GSF) y el hexaclorobenceno (HCB).

Todas las sustancias químicas mencionadas tienen la propiedad de inducir la actividad de ALA-S hepática. El hecho que compuestos de tan diversas estructuras ejerzan efectos sobre una misma enzima tiene su explicación si se consideran las propiedades comunes a todos ellos. Esto es, que todas estas sustancias producen una disminución del hemo intracelular, con el consiguiente descenso en el control de retroalimentación que ejerce ese compuesto sobre la enzima ALA-S. Ya sea por inhibición de su formación (griseofulvina), por aumento de la degradación (AIA, DDC) o por su mayor consumo (fenobarbital), el contenido intracelular de hemo hepático disminuye produciendo el aumento de la síntesis de ALA-S.

<u>DROGA</u>	<u>ACCION BIOQUIMICA</u>	<u>ACUMULACION Y EXCRECION</u>	<u>PORFIRIA</u>
AIA	Aumenta degradación de hemoproteínas	ALA, PBG y porfirinas en hígado y orina	Porfiria hepática aguda
DDC	Inhibe ferroquelatasa. Aumenta degradación hemoproteínas	Protoporfirina en hígado y heces	Variegata
GSF	Inhibe ferroquelatasa	Copro y protoporfirina hígado y heces. ALA y PBG en orina	Protoporfirina
HCB	Inhibe URO-D	Porfirinas de 4 a 8 carbonos, hígado, orina y heces	PCT

El plomo es también causante de anomalías en la biosíntesis de hemo, conduciendo a un estado porfirico caracterizado por la excreción urinaria aumentada de ALA y coproporfirina y niveles elevados de protoporfirina en eritrocitos (375). En eritrocitos y otros tejidos, los metales pesados inhiben varias enzimas de la biosíntesis del hemo, incluyendo ALA-D, PBGasa y ferroquelatasa (375).

### DIABETES Y PORFIRIA

La diabetes mellitus es una enfermedad caracterizada por estar afectada en el organismo la capacidad de utilizar hidratos de carbono. Es esta una enfermedad metabólica, claramente afectada por factores genéticos y ambientales, los cuales se influyen mutuamente produciendo trastornos complejos y de múltiple localización. Su incidencia es muy alta en todas las razas y sociedades humanas (376).

Hasta la década del 70, la hipótesis más generalizada, asignaba la predisposición a la diabetes mellitus, a la transmisión mendeliana de un gen recesivo (377). A partir de esa década, diversos genetistas han dejado de lado dicha hipótesis para adherir a una caracterizada por la multiplici-

dad de factores (378). Esta hipótesis establece que hay alelos en un número no especificado y en diferentes locus, los que por su acción combinada producen predisposición a la diabetes y que la precisa combinación de alelos responsables de esta predisposición, puede variar de un diabético a otro.

También hay publicadas evidencias favoreciendo la hipótesis de una transmisión dominante del tracto diabético o de un antagonista a la acción de la insulina que estaría implicado en la patogénesis de la diabetes.

#### Distintas clases de diabetes

Una de las características más atractivas de la hipótesis de transmisión hereditaria multifactorial, es que puede dar cuenta de la gran variabilidad de manifestaciones clínicas que causa la diabetes mellitus en el hombre. Pese a esta gran variabilidad se han agrupado en dos síndromes principales conocidos como diabetes tipo 1 o juvenil, insulina dependiente y diabetes tipo 2 o del adulto, insulina independiente. Sin embargo, es ampliamente aceptado que esta separación no puede hacerse desde el punto de vista genético (379).

La diabetes del tipo 1 puede tener, en apariencia, múltiples causas, incluyendo factores genéticos, ambientales (factores virales, nutricionales) y autoinmunológicos. En algunos casos puede haber involucrada en su etiología una compleja interacción entre estos diversos factores. En la diabetes del tipo 2 parece existir un defecto en los receptores celulares fijadores de insulina involucrando, así mismo, posibles factores hereditarios. En otros casos se presume la presencia de un tipo anormal de insulina de menor actividad. En todos estos casos es obvia la existencia de factores genéticos.

#### Asociación de diabetes con otras enfermedades

La asociación de diabetes con otras enfermedades o con ciertas características genéticas pueden servir de marcadores genéticos, útiles para una mayor caracterización de la enfermedad (380).

La diabetes se encuentra en la mitad de los casos de síndrome de Werner y asociado con cierta frecuencia en casos de ataxia de Friedreich, síndrome de Turner y otros. También ha sido sugerida la asociación de diabetes con anemia perniciosa e hipertiroidismo (376).

Desde los trabajos de Sterling en 1949 (381) varios autores han puntualizado la relativa frecuencia de coexistencia entre diabetes mellitus

y algún tipo de porfiria hepática, sobre todo la aguda intermitente y la cutánea tarda. Ambas enfermedades tienen en común que se producen por un trastorno metabólico e intervienen en sus etiologías un fuerte factor hereditario.

Los datos aportados en la literatura no son coincidentes en cuanto al porcentaje de asociación de ambas enfermedades, pero varían según los autores y las poblaciones estudiadas entre un 2 y un 25% de diabéticos que contraen porfiria (382, 383). Estas observaciones plantean el interrogante si la precipitación de porfiria en pacientes diabéticos es debida a la acción de factores endógenos o exógenos que facilitan la expresión de defectos genéticos en el camino metabólico del hemo.

#### Diabetes experimental

La diabetes mellitus experimental puede ser producida por uno de los siguientes procedimientos (376): 1) la extracción quirúrgica del páncreas o al menos de una porción importante del mismo; 2) la destrucción química de las células beta de los islotes de Langerhans, productoras de insulina, lo que puede ser logrado por la administración de sustancias tales como aloxano, ácido dehidroascórbico, ditizona o estreptozotocina; 3) la inactivación de la insulina circulante por la administración de anticuerpos específicos contra la propia insulina del animal de experimentación; 4) la administración de agentes farmacológicos tales como manoheptulosa o diazóxido, capaces de inhibir, reversiblemente, la liberación de insulina.

#### Inducción de diabetes por estreptozotocina

La estreptozotocina (STZ), es una nitrosourea unida al C-2 de una d-glucosa, que exhibe una toxicidad selectiva para las células beta del páncreas y es, junto con el aloxano, la más potente droga diabetogénica. Sin embargo, el mecanismo de acción sobre dichas células no ha sido aun completamente aclarado (384). Yamamoto y col. proponen un mecanismo común para la inducción química de diabetes (385). La adición de la droga diabetogénica produciría una ruptura en el DNA de las células beta, bien por interacción directa o vía reacciones con radicales libres de oxígeno formados a partir de dicha droga. Estas lesiones producirían la activación de la poli (ADP) ribosa sintetasa, una enzima nuclear, estrechamente asociada con la cromatina que, a partir de la estructura ADP-ribosa del NAD, sintetiza

poli ADP-ribosa, necesaria para la reparación del DNA. Esta situación causaría una disminución del contenido de NAD de las células beta lo que conduciría a una depresión de las funciones celulares, incluida la síntesis de proinsulina.

Otros investigadores han sugerido que el daño en las células beta por STZ puede activar un proceso autoinmune que resulta en un daño aun mayor para la célula (386). Mecanismos inmunológicos tendrían un papel preponderante en la inducción de diabetes por STZ. Paik y col.(387) han encontrado una falta de inducción de diabetes por dosis repetidas de STZ en ratones atímicos. Buschard y col.(388) demostraron que linfocitos de pacientes con diabetes inducían hiperglicemia en ratones "nude". Estos resultados sugieren que los linfocitos T juegan un papel importante en la inducción de diabetes luego de la administración de STZ. Ello podría deberse a que las células T pueden transformarse en células citotóxicas especialmente reactivas con las células beta del páncreas o que, células T puedan ser requeridas como células "helper" para la producción de autoanticuerpos específicos para la células beta (386).

## MATERIALES Y METODOS



## MATERIALES

Las siguientes sustancias fueron adquiridas a Sigma Chemical Co. St. Louis (USA): Trizma Base; glutation reducido; iodoacetamida; seroalbúmina bovina; azul tripán; N<sup>6</sup>,O<sup>2'</sup>-dibutiriladenosina 3':5'-monofosfato cíclico (dibutiril AMPc); cicloheximida; estreptozotocina; actinomicina D; piridoxal-5'-fosfato; adenosina-5'-trifosfato; coenzima A; papaverina; etilenglicol-bis-(beta-amino etileter) N,N'-tetraacético (EGTA); colagenasa tipo I; hialuronidasa tipo I-S; medio HAM F12 sin glucosa; adrenalina; 2,5-difeniloxazol (PPO); 1,4-bis-[4-metil-5-fenil-2-oxazolil] benceno (dimetil POPOP); deoxicolato de sodio; dodecil sulfato de sodio (SDS); ácido delta-aminolevulínico; 3-isobutil-1-metil-xantina; adenosina; imidazol y aloxano.

Sephadex G-25, Sephadex G-200 y Sephacryl S-300 fueron procedentes de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (Suecia).

Mesoporfirina IX dimetil éster fue comprada a Koch-Light Laboratories (Gran Bretaña).

Las determinaciones cuantitativas de glucosa fueron realizadas utilizando el equipo de Glicemia de Laboratorio Wiener (Argentina). Para determinaciones semicuantitativas de glucosa en sangre y orina se utilizaron tiras reactivas Dextrostix de Laboratorio Miles (Argentina) y Tes-Tape de Eli Lilly (Argentina), respectivamente.

Los compuestos radioactivos L-Leucina [4,5-<sup>3</sup>H (N)] y [2,8-<sup>3</sup>H]AMPc fueron adquiridos a New England Nuclear (EE.UU.) y a Amersham International (Gran Bretaña), respectivamente.

La forskolina fue generosamente donada por el Dr J. W. Daly. El Tritón X-100 y alilisopropilacetamida (AIA) fueron obsequiadas por Rohme y Haas (Argentina) y Roche S.A. (Argentina), respectivamente.

Todas las demás sustancias utilizadas fueron de grado analítico.

## MÉTODOS UTILIZADOS EN LA PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FERRO- Y COBALTOQUELATASA DE HIGADO DE CERDO

### PREPARACION DE MITOCONDRIAS DE HIGADO DE CERDO

El hígado de un cerdo recién faenado, fue inmediatamente extraído y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Las mitocondrias fueron preparadas del siguiente modo, de acuerdo al método de Hogeboom (389). Todas las operaciones fueron realizadas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se cortaron 100 gramos de tejido en trozos pequeños y se lavaron 2 veces con  $\text{NaCl}$  0,9%; posteriormente se agregaron 200 ml de sacarosa 0,25 M y se homogeneizó en licuadora. El homogenato fue centrifugado a  $2.000\times g$  durante 10 min; el sobrenadante obtenido fue centrifugado a  $10.000\times g$  durante 12 min. El pellet mitocondrial resultante fue despegado de las paredes del tubo y lavado 2 veces con 200 y 100 ml, respectivamente, de sacarosa 0,25 M, centrifugando a  $10.000\times g$  cada vez, y guardado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para todas las operaciones fue utilizada una centrifuga refrigerada Sorvall RC-5B, rotor SS-34 de ángulo fijo.

### PURIFICACION DE FERRO-Y COBALTOQUELATASA

Al comenzar la purificación, las mitocondrias congeladas fueron descongeladas y tratadas con Tritón X-100 25 mg/ml (2,5% p/v) dejándolas, luego, a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 18 horas. Transcurrido este período fueron descongeladas, agregándose, posteriormente, un volumen igual de buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1). Luego de 15 min fueron centrifugadas a  $20.000\times g$  durante 30 min; el sobrenadante fue considerado como la "fracción solubilizada". La actividad de ferro y cobaltoquelatasa en el precipitado fue despreciable. La fracción solubilizada fue sometida a un fraccionamiento salino. Para ello el sulfato de amonio sólido fue agregado con agitación continua a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta lograr un 20% de saturación. La suspensión fue agitada durante 30 min y luego centrifugada a  $15.000\times g$  por 30 min. El precipitado fue descartado y el sobrenadante tratado con sulfato de amonio, en las mismas condiciones, hasta 50% de saturación. En ambos agregados de la sal, el pH fue mantenido en 8,1 por adición de  $\text{NaOH}$  1 M cuando fue necesario. Luego de 30 min de agitación la suspensión fue centrifugada a  $15.000\times g$  por 30 min. El precipi-

tado obtenido fue resuspendido en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1) en una concentración proteica, aproximadamente, de 20 mg/ml. Este precipitado resuspendido fue sembrado en una columna de Sephacryl S-300 (62 cm x 1,6 cm), previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1) con o sin la adición de Tritón X-100 1%. Las proteínas fueron eluidas con el mismo buffer con un flujo de 10 ml/cm<sup>2</sup> h<sup>-1</sup>. Se recogieron fracciones de 1,5 ml. La fracción activa fue utilizada para la determinación de propiedades, como la fracción purificada.

### OTROS METODOS UTILIZADOS

#### Sonicación

Las sonicaciones fueron realizadas en suspensiones de 3 ml de volumen, en un sonicador-disruptor celular Branson Sonic Power, operado a 150W con punta de titanio de 10 mm de diámetro, durante los tiempos indicados en cada experimento, distribuidos en pulsos de 15 seg. Durante la sonicación, la suspensión fue refrigerada en un baño de hielo. La suspensión resultante fue centrifugada a 20.000xg durante 30 min y el sobrenadante utilizado como fuente de enzima.

#### Tratamiento con detergentes

Las mitocondrias fueron tratadas con diferentes detergentes en las concentraciones indicadas en cada experimento. Fueron congeladas durante cada tratamiento por 1 ó 18 horas y descongeladas a su finalización. Luego fueron diluidas con un volumen igual de buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1) y, luego de 15 min, centrifugadas a 20.000xg durante 30 min: El sobrenadante constituyó la fracción solubilizada con cada detergente. Centrifugaciones realizadas a 20.000xg ó 105.000xg durante 60 ó 90 min dieron resultados similares a los obtenidos con centrifugaciones a 20.000xg por 30 min. En todos los casos los precipitados presentaron actividades de ferro y cobaltoquelatasas despreciables. Las centrifugaciones a 105.000xg fueron realizadas en una centrifuga Beckman L-2, rotor SW 50.

#### Tratamiento con gel de fosfato, calentamiento y acidificación

Los detalles experimentales están explicados en la Tabla correspondiente.

### Diálisis

La fracción solubilizada fue dializada en una membrana Spectrapor 4, de límite de resolución del poro de 12.000-14.000 D, contra agua a 4°C, durante 24 horas, con agitación continua y con dos recambios del agua de contradiálisis. El dializado fue centrifugado a 20.000xg durante 30 min. En el sobrenadante y en el precipitado resuspendido en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1), fueron determinadas las actividades de ferro y cobaltoquelatasa.

### Ultrafiltración

Diez ml de la fracción solubilizada fueron ultrafiltrados a través de una membrana de celulosa Spectrapor 4, durante 6 horas, según el dispositivo ideado por Goldberg (390). Posteriormente se midió la actividad de ferro y cobaltoquelatasa en la fracción ultrafiltrada y en el residuo, como también en una mezcla de residuo más ultrafiltrado en una proporción 7:1 (v/v).

### FILTRACION POR GELES

Se emplearon geles de los siguientes tipos y en columnas de las dimensiones detalladas: Sephadex G-25 (17 cm x 2 cm); Sephadex G-200 super fino (58 cm x 1,6 cm); Sephacryl S-300 (62 cm x 1,6 cm). Las corridas fueron realizadas en una cámara a 4°C y en los 2 últimos casos se recogieron fracciones de 1,5 ml en un colector de fracciones Gilson, modelo MFK.

Los bufferes de elución se indican en cada caso en particular. La concentración de proteínas de cada fracción eluída fue determinada por el método de Warburg y Christian (391) y en algunos casos por el método de Lowry y col.(392). Trescientos microlitros de cada una de las fracciones fueron utilizados para la determinación de actividades enzimáticas de ferro-y cobaltoquelatasa.

### Proteínas marcadoras

Las columnas de Sephadex G-200 y Sephacryl S-300 fueron calibradas con proteínas marcadoras, de características conocidas, para la determinación del peso molecular de ferro- y cobaltoquelatasa.

<u>Proteína marcadora</u>	<u>Peso molecular</u>	<u>Siembra (mg)</u>
beta-galactosidasa	520.000	10
catalasa	245.000	10
glucosa oxidasa	152.000	10
seroalbúmina bovina	66.000	15
ovoalbúmina	44.000	15
citocromo c	13.300	10

#### Determinación de proteínas marcadoras

Beta-galactosidasa: Se siguió el método descrito en el manual de Worthington (393), utilizando o-nitrofenil beta-D-galactopiranosido como sustrato.

Catalasa: Se midió la actividad enzimática valorando el sustrato no consumido ( $H_2O_2$ ) con solución de KI de acuerdo al método de Terenzi y col. (394).

Glucosa oxidasa: Se siguió la técnica de Hugget y Nixon (395), modificada por el acople del sistema peroxidasa-o-dianisidina.

Seroalbúmina bovina: La presencia de esta proteína se detectó por absorbancia a 230 nm.

Ovoalbúmina: La presencia de esta proteína se detectó por absorbancia a 230 nm.

Citocromo c: Se valoró por espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 410 nm.

#### ELECTROFORESIS

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS fue efectuada usando un gel 10%, de acuerdo al método de Laemli (396), y corrida en buffer Tris-glicina 0,05 M (pH 8,9), conteniendo SDS 0,03%. La muestra proteica fue tratada, en partes iguales, con una solución conteniendo: 50 ul de beta-mercaptoetanol; 300 ul de SDS 10%; 125 ul de buffer de corrida, 500 ul de glicerol y 50 ul de azul de bromofenol, durante 5 min a 80°C. La electroforesis fue corrida a 4°C durante 3 horas, aproximadamente. Posteriormente, el gel fue teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25%, disuelto en metanol/ácido acético/agua (30:7:63 v/v) y luego desteñido con

metanol/ácido acético/agua (30:10:60 v/v). Fueron corridas simultáneamente las siguientes proteínas marcadoras: seroalbúmina bovina (66.000), ovoalbúmina (44.000) y glicero-3-fosfato deshidrogenasa (36.000). La densitometría del gel teñido fue realizada en un densitómetro Metrolab digital con graficador.

## PROPIEDADES

### Espectro de absorción

El espectro de absorción de la proteína activa purificada, en una solución de 100 ug/ml en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1), fue registrado en un espectrofotómetro Beckman DB entre 230 y 620 nm, a intervalos de 5 nm.

### Gráfico de Arrhenius

Las energías de activación de las reacciones catalizadas por la ferro- y cobaltoquelatasa fueron calculadas a partir de la ecuación de Arrhenius:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{RT^2} \quad (397)$$

siendo  $E_a$  la energía de activación y  $k$  la constante de velocidad. Graficando el logaritmo decimal de la velocidad inicial de la reacción en función de la inversa de la temperatura absoluta, se obtuvo, de la pendiente de la recta obtenida, el valor de la energía de activación.

### Determinación de los valores de los parámetros cinéticos

A los efectos de la determinación de los valores de  $K_m$  y  $V_{máx}$ , se utilizó el tratamiento de Lineweaver-Burk (398) para los datos obtenidos en el estudio de las velocidades iniciales ( $v$ ) en función de diferentes concentraciones de sustrato ( $S$ ), según la ecuación de Michaelis-Menten.

### Preparación de las suspensiones de lípidos

Cada suspensión de ácidos grasos, fosfolípidos o colesterol fue preparada por dispersión del lípido en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1) con un sonicador Branson Sonic Power operado a 150 W a 0°C durante 2 minutos en pulsos de 15 seg (399). La suspensión resultante de la sonicación fue inmediatamente agregada a la mezcla de incubación.

## DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES DE FERRO Y COBALTOQUELATASA

Ambas actividades enzimáticas fueron determinadas por medición de la formación de ferro y cobaltomesoporfirina, basadas en el método de Porra y Jones (163). Para la determinación de la actividad de ferroquelatasa, la mezcla de reacción contenía, además de la proteína enzimática, 155 nmoles de  $\text{FeCl}_2$ , 100 nmoles de mesoporfirina y 25  $\mu\text{moles}$  de glutatión reducido en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1), en un volumen final de 3 ml. En la determinación de la actividad de cobaltoquelatasa, la mezcla de reacción contenía, además de la proteína enzimática, 155 nmoles de  $\text{CoCl}_2$  y 200 nmoles de mesoporfirina en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1), en un volumen final de 3 ml. La cantidad de proteína utilizada en cada ensayo dependió de la fracción utilizada, pero varió entre 40 y 5  $\mu\text{g}$  cuando fueron ensayadas la fracción mitocondrial o la fracción purificada, respectivamente. Las incubaciones fueron llevadas a cabo a  $37^\circ\text{C}$  bajo atmósfera de nitrógeno durante 90 min. Inmediatamente después, se agregaron 25  $\mu\text{moles}$  de iodoacetamida, en un volumen de 0,5 ml, en los tubos conteniendo glutatión. A cada tubo se agregaron 0,7 ml de piridina y 0,35 ml de NaOH 1 M y 0,2 ml de agua, a los tubos conteniendo iodoacetamida, y 0,7 ml a los restantes. La solución fue dividida, en volúmenes iguales, en dos cubetas. A una de ellas se le agregaron 0,05 ml de  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  3 mM (referencia) y 2 mg de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  a la restante (muestra). El espectro diferencia entre el complejo piridina-hemocromógeno oxidado y reducido fue medido en un espectrofotómetro Beckman DB. La formación de producto fue calculada de la ecuación:

$$\text{ferro/cobaltomesoporfirina (nmoles)} = \frac{1000 \times v \times (A_{\text{max}} - A_{\text{min}})}{(E_{\text{max}} - E_{\text{min}})}$$

donde  $v$  es el volumen (ml) de la solución alcalina de piridina y  $(A_{\text{max}} - A_{\text{min}})$  representa la diferencia de absorbancia entre el máximo de la banda alfa y el mínimo entre las bandas alfa y beta (400). Los valores usados para  $E_{\text{mM}}$  fueron (400):

$$\text{piridina mesohemocromógeno: } E_{547}(\text{mM}) - E_{531}(\text{mM}) = 21,7$$

$$\text{piridina mesocobaltocromógeno: } E_{551}(\text{mM}) - E_{535}(\text{mM}) = 12,5$$

Medición de mesoporfirina

La concentración del sustrato mesoporfirina en solución, fue determinada por el método de Rimington (401). Se determinaron las absorbancias de una solución de mesoporfirina en HCl 0,1 M a 380 y 430 nm y en el máximo correspondiente a la banda de Soret ( $A_{max}$ ), calculándose la cantidad de mesoporfirina por la siguiente fórmula:

$$\text{nmoles de mesoporfirina} = 2 A_{max} - (A_{380} + A_{430}) \times 1,203 \times \text{dilución}$$

DETERMINACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas fue determinada en las distintas fracciones por el método de Lowry y col.(392). Las proteínas, antes de su determinación fueron sometidas a un pretratamiento alcalino con NaOH 1 M, calentando a 80°C durante 5 min. Curvas de calibración, utilizando seroalbúmina bovina como estándar, fueron realizadas, obteniéndose valores de 1/tg de 0,19 y 0,21 para proteínas solubles e insolubles, respectivamente.

La elución de proteínas de las columnas fue seguida por la medición de absorbancia a 260 y 280 nm de acuerdo al método descrito por Warburg y Christian (391) y empleando la siguiente ecuación:

$$\text{proteínas (mg/ml)} = 1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}$$



## MÉTODOS UTILIZADOS EN EXPERIMENTOS CON HEPATOCITOS DE RATA

### ANIMALES

Fueron utilizadas ratas albinas chbb THOM entre 150-200 gr de peso, provenientes del Bioterio de la FCE y N. Estos animales fueron mantenidos en condiciones estandarizadas de luz (entre 6:30 y 18:30) y temperatura (21-22°C) y alimentados con una dieta del Laboratorio Purina y agua. Los animales fueron ayunados 24 horas antes de su utilización y sacrificados entre las 7 y las 9 de la mañana, de acuerdo a las normas del Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas.

### OBTENCION DE HEPATOCITOS AISLADOS

#### Soluciones utilizadas

Solución A: Buffer fosfato Dulbecco, libre de glucosa,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (pH 7,4) Esta solución contiene por litro: NaCl, 8000 mg; KCl, 200 mg;  $KH_2PO_4$ , 200 mg;  $Na_2HPO_4$ , 1140 mg.

Solución B: Solución A + EGTA 190 mg/l

Solución C: Solución salina balanceada de Hank, libre de glucosa,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (ph 7,4). Esta solución contiene por litro: NaCl, 8000 mg; KCl, 400 mg;  $KH_2PO_4$ , 60 mg;  $Na_2HPO_4$ , 50 mg;  $NaHCO_3$ , 840 mg; ro jo fenol, 10 mg.

Solución D: Solución C, conteniendo por litro:  $CaCl_2$ , 550 mg; colagenasa, 500 mg; hialuronidasa, 1000 mg.

Medio de suspensión: HAM F12, sin glucosa (pH 7,4).

Solución azul tripan 0,4%: En un vaso de precipitados se colocaron 0,4 gr de azul tripan; 0,81 gr de NaCl; 0,06 gr de  $K_2HPO_4$  y 0,05 gr de metil-p-hidroxibenzoato como preservador. Se agregaron 95 ml de

H<sub>2</sub>O y se calentó a ebullición para disolver. Se enfrió y se ajustó a pH 7,4 con NaOH 1 M. Se lleva a 100 ml con H<sub>2</sub>O. La solución fue estable por 3 meses.

#### Obtención del hígado

Las ratas fueron transferidas cuidadosamente a un recipiente de 4 litros cuya boca fue luego tapada con un papel de filtro, sobre el cual se fue agregando lentamente 10 ml de éter. Esta gradual introducción de éter evita la vasoconstricción inducida por catecolaminas en un animal ansioso y estresado. Además disminuye la posibilidad de un colapso vascular al cual están sujetos los animales con una profunda anestesia con éter (402). Una vez lograda una ligera anestesia, la rata fue inmovilizada de espaldas y su abdomen humedecido con etanol 96%. Se practicó una insisión hasta exposición completa del peritoneo y se cortaron cuidadosamente los ligamentos del hígado con el diafragma y el estómago. Posteriormente fue canulada la vena porta con una tubuladura plástica atóxica T8 (Laboratorio Rivero) e introducida en ella una jeringa plástica de 20 ml (Terumo) con una aguja 21G1 (Terumo). A través de ella se perfundió lentamente un volumen, generalmente de 40 a 50 ml, de la solución A hasta lograr un blanqueo completo del hígado. Este fue luego extraído y lavado exteriormente con solución A. Luego del lavado, fue secado con papel de filtro, retirándose cuidadosamente el tejido conectivo y vascular remanente.

#### Preparación de hepatocitos

Los hepatocitos fueron obtenidos de acuerdo al método de Fry y col. (403). Los hígados fueron colocados sobre un vidrio recubierto por un papel de filtro y colocado sobre un recipiente con hielo. Los lóbulos hepáticos fueron cortados con un bisturí en trozos entre 0,5-1 mm de espesor. Estos fueron, luego, puestos dentro de un erlenmeyer de 250 ml (5 g por recipiente), conteniendo 20 ml de solución A y colocados en un baño termostático Dubnoff a 37°C con agitación (aproximadamente 80 oscilaciones/minuto) durante 10 min. Luego el sobrenadante fue desechado y el lavado repetido una vez más. Después de estos lavados, continuaron dos incubaciones, de 10 min cada una, con 20 ml de solución B. La presencia de EGTA en la solución B facilita la dispersión enzimática de las células hepáticas, debido a la extracción del Ca<sup>2+</sup> que produce un cambio irreversible

en el factor de cohesión presente en los desmosomas (404). Luego del tratamiento con EGTA, cada erlenmeyer recibió 20 ml de solución D, conteniendo las enzimas dispersantes de células. Estos se incubaron durante 60 min a 37°C con agitación (80 oscilaciones/min). El sobrenadante resultante fue filtrado a través de 3 capas de gasa de algodón para eliminar grandes agregados de células y material no digerido. El filtrado fue centrifugado a 500xg por 3 min y el pellet celular fue lavado 2 veces con solución A. Finalmente los hepatocitos obtenidos fueron resuspendidos en el medio HAM F12.

#### Determinación del número de células y de su viabilidad

Para la determinación de la viabilidad celular se utilizó el método de exclusión del azul tripán, basado en que las células que conservan intacta la membrana plasmática excluyen los colorantes tales como azul tripán, nigrosina y eosina (405). Para ello se colocaron 50 ul de la suspensión de hepatocitos en 1 ml de solución C y 0,2 ml de la solución de azul tripán al 0,4%. Una gota de la solución así obtenida fue colocada en un borde de una cámara de Neubauer con un cubreobjetos, dejando que penetrara en ella por capilaridad.

La observación de las células fue realizada al microscopio óptico con un aumento de 40X entre los 4 y los 8 minutos del agregado del colorante. De este modo, la más leve tinción del núcleo de la célula se consideró como un daño en la membrana celular y determinó la no viabilidad de la célula.

El conteo de las células se realizó en los 4 cuadrados grandes de las esquinas de la cámara de Neubauer (64 cuadrados medianos) y el número de células totales por ml y el porcentaje de viabilidad se calculó por las siguientes fórmulas:

$$\text{células por ml} = N \times \frac{1}{4} \times 1000 \times 25$$

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{células no teñidas}}{\text{células totales}} \times 100$$

Los hepatocitos fueron resuspendidos en medio HAM F12, sin glucosa, en una concentración de  $(4-6) \times 10^6$  células viables/ml.

### DETERMINACION DE GLUCOSA

Todas las determinaciones de glucosa fueron realizadas por el método de Dubowski (406), basado en la reacción con o-toluidina. Para la medición del contenido de glucosa en hepatocitos, 1 ml del homogenato de células hepáticas fueron tratadas con 1 ml de TCA 10% y luego centrifugado a 3000xg durante 15 min. La glucosa fue determinada en el sobrenadante resultante.

Para la determinación de la glucosa liberada por los hepatocitos, 2 ml de suspensión celular fueron centrifugados a 1000xg durante 3 min y el monosacárido determinado en el sobrenadante. La concentración de glucosa en suero de rata fue determinada directamente con sangre proveniente de una punción cardíaca.

El control rutinario, semicuantitativo, de la glucosa en sangre de los animales, fue determinado por tiras reactivas Dextrostix, con una gota de sangre de la cola. La determinación, semicuantitativa de la glucosuria, fue realizada con el Tes-Tape, con una gota de orina.

### DETERMINACION DE LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

La actividad de LDH fue determinada en una alícuota del medio, libre de células, obtenido luego de centrifugar 1 ml de suspensión de hepatocitos a 900xg por 3 min. Para determinar la actividad total de la enzima, la suspensión de células fue lisada por tratamiento con Tritón X-100 0.5% (v/v). La actividad enzimática fue determinada según Moldéus y col.(407). En un volumen final de 1 ml de buffer Krebs-Henseleit, 50  $\mu$ l de medio libre de células o de lisado, fueron incubados con NADH 0,2 mM y piruvato 1,36 mM (concentraciones finales), registrándose la variación de absorbancia a 340 nm debido a la oxidación del NADH en un espectrofotómetro Beckman DB.

### DETERMINACION DE GLUTAMATO DESHIDROGENASA

La actividad de la glutamato deshidrogenasa fue determinada por el método de Sedgwick y Frieden (408) descripto para hígado de rata.

### DETERMINACION DE PROTEINAS

La determinación de proteínas en hepatocitos fue precedida por la obtención del pellet celular, luego de la centrifugación de una alícuota de la suspensión a 900xg por 3 min y su posterior lavado con solución A. Este pellet celular fue resuspendido en TCA 5% y centrifugado a 5000xg por 10 min. En el precipitado fueron determinadas proteínas por el método de Lowry y col.(392) según se indica para proteínas insolubles.

### EXPERIMENTOS DE INDUCCION

Las suspensiones de hepatocitos fueron incubadas en un baño termostático Dubnoff a 37°C con agitación (60 oscilaciones/min). Las sustancias agregadas a las suspensiones de hepatocitos, lo fueron en volúmenes pequeños, generalmente 0,1 ml, de medio HAM F12. Luego de los tiempos de incubación indicados en cada experimento, alícuotas de las suspensiones celulares fueron removidas y centrifugadas a 900xg durante 3 min. Luego de descartar el sobrenadante, las células fueron lavadas una vez con un volumen, igual al de la alícuota, de solución C y el pellet resultante fue resuspendido en el medio de homogenización, indicado en cada caso para la medición de las actividades enzimáticas correspondientes, en un volumen igual al de la alícuota. Para la determinación del contenido de citocromo P-450, alícuotas de la suspensión de hepatocitos, fueron extraídas a los tiempos de incubación correspondientes en cada experimento y diluidas con solución A, hasta una concentración de  $0,5 \times 10^6$  células por ml.

### DETERMINACION DEL CONTENIDO DE AMPcíclico EN HEPATOCITOS

#### Extracción del AMPcíclico

Para la medición del contenido intracelular de AMPc, alícuotas de la suspensión de hepatocitos conteniendo, aproximadamente,  $5 \times 10^6$  células fueron centrifugadas a 900xg durante 3 min. El pellet celular fue inmediatamente resuspendido en 2 ml de TCA 5% conteniendo 2 pmoles de [2,8-<sup>3</sup>H] AMPc (actividad específica 38 Ci/mmol) y homogeneizados en un homogenizador Potter-Elvehjem de teflón-vidrio. El homogenato fue centrifugado a

27.000xg durante 20 min. El sobrenadante fue transferido a tubos donde se extrajo 6 veces, a temperatura ambiente, con 2 volúmenes de éter etílico saturado con agua. El éter etílico remanente fue removido de la solución acuosa por inmersión de los tubos en un baño de agua a 80°C durante 2 min. Las muestras fueron evaporadas bajo presión reducida y disueltas en 0,5 ml de buffer Tris-HCl 6,7 mM (pH 7,6) conteniendo EDTA 0,45 mM y teofilina 1 mM. Alícuotas de 50 ul de esta solución, fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa, secadas y contadas en un contador de centelleo líquido Tracor-Analitic Mark III. La recuperación del [<sup>3</sup>H]AMPc fue entre el 85-95%.

#### Medición del AMPc cíclico

En diferentes alícuotas de cada una de las muestras, fue determinado el contenido de AMPc por el método de Tsang y col.(409), usando una proteína de unión específica al AMPc de corteza de adrenal bovina (410).

#### Líquido de centelleo

Para los experimentos de determinación del contenido de AMPc y de incorporación de [<sup>3</sup>H]-leucina, descrito más adelante, se utilizó una mezcla centellante de la siguiente composición: PPO, 4 gr; dimetil POPOP, 0,05 gr por litro de una solución Tolueno/Tritón X-100 (2:1 v/v).

### INCORPORACION DE <sup>3</sup>H-LEUCINA EN PROTEINAS DE HEPATOCITOS

#### Incubación con [<sup>3</sup>H]-leucina

Diez ml de la suspensión de hepatocitos en medio HAM F12, conteniendo 10 uCi de L-4,5[<sup>3</sup>H]-leucina (actividad específica 60 Ci/mmol), fueron incubados a 37°C en un baño Dubnoff con agitación (60 oscilaciones/min). A los tiempos indicados en cada experimento, se tomaron alícuotas de 1 ml de cada uno de los incubados, agregándoseles 0,1 ml de cicloheximida 1 mM. Luego fueron centrifugadas a 900xg durante 3 min; el pellet celular resultante fue procesado para la determinación de radioactividad intracelular.

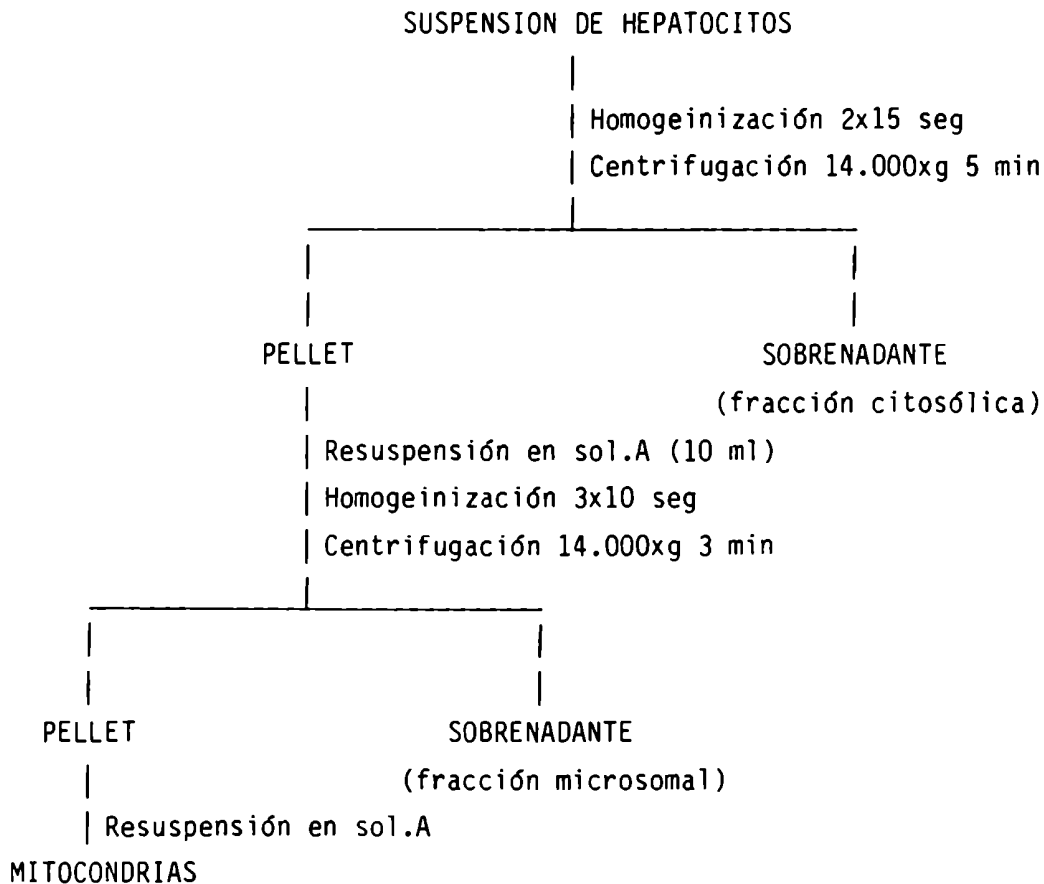
#### Determinación de la radioactividad incorporada a proteínas

La preparación de las muestras para el conteo de radioactividad fue realizada de acuerdo a Cajone y Bernelli-Zazzera (411), aunque con al-

gunas modificaciones. El pellet celular fue tratado con 2 ml de TCA 10%. Luego de 10 min, fue centrifugado a 5000xg durante 10 min, descartándose el sobrenadante. El precipitado fue lavado 3 veces con 2 ml, cada vez, de TCA 5%, conteniendo en el último lavado 10 mg/ml de leucina. Luego de ello fue sometido a un lavado con 2,5 ml de una mezcla metanol/éter/cloroformo (1:1:2 v/v). Una vez seco, el precipitado fue disuelto en 2 ml de NaOH 1 M calentando a 80°C durante 5 min. Alícuotas de 0,2 ml de esta solución fueron contadas en un contador de centelleo líquido, utilizando el líquido centellante ya descrito. La eficiencia del conteo fue del 38%.

#### FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE LOS HEPATOCITOS

El fraccionamiento subcelular de los hepatocitos de rata fue efectuado de acuerdo al método de Lodola y col.(412) que se esquematiza más abajo, excepto que la solución A fue utilizada como medio de homogenización y resuspensión. Todas las operaciones se realizaron en frío.



Las homogenizaciones fueron realizadas en un Potter-Elvehjem con homogenizador de teflón y las centrifugaciones en una centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B, rotor SS-34.

#### INDUCCION DE DIABETES EXPERIMENTAL EN RATAS

La diabetes experimental en ratas fue inducida, en todos los experimentos, por la administración intravenosa, de una sola dosis de estreptozotocina (65 mg/kg de peso) en animales anestesiados con éter. La droga fue preparada en el momento de ser usada, en NaCl 0,9% acidificado a pH 4,5 con ácido cítrico 0,05 M, según recomiendan Junod y col.(413). Los animales fueron sacrificados a los 5, 15 y 30 días de la administración de STZ para el estudio de la evolución del estado diabético; en el resto de los experimentos fueron utilizados animales luego de 15 días de haber sido inyectados.

El criterio usado para establecer la severidad del estado diabético fue una extensión del descrito por Steiner (414) e incluyó la medición de glucosuria, polidipsia, poliuria y polifagia. También fueron seguidas la velocidad y dirección de los cambios en el peso corporal.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE SUCCINIL CoA SINTETASA

Los hepatocitos fueron resuspendidos en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) y se homogeneizaron en un Potter-Elvehjem con homogenizador de teflón (3x10 seg). Los homogenatos fueron inmediatamente congelados en un baño de acetona/hielo seco y guardados a -20°C hasta el día siguiente. La actividad de succinil CoA sintetasa fue determinada por el método descrito por Kaufman y Alivisatos (7). Una unidad de succinil CoA sintetasa fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 umol de ácido succinilhidroxámico en 30 min a 37°C.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-D

Los hepatocitos fueron resuspendidos en sacarosa 0,25 M conteniendo KCl 0,15 M y se homogeneizaron en un Potter-Elvehjem con homogenizador



de teflón (3x10 seg). Los homogenatos fueron inmediatamente congelados en un baño de acetona/hielo seco y guardados a -20°C hasta el día siguiente. La actividad de ALA-D fue determinada por el método de Gibson y col.(415). Una unidad de ALA-D fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de PBG en 1 hora a 37°C.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ALA-S

Los hepatocitos fueron resuspendidos en un medio conteniendo Tris-HCl 0,01 M (pH 7,4), EDTA 0,1 mM y fosfato de piridoxal 0,1 mM en sacarosa 0,25 M y homogeneizados en un Potter-Elvehjem con homogeinizador de teflón (3x10 seg). Los homogenatos fueron congelados inmediatamente en un baño de acetona/hielo seco y guardados a -20°C hasta el día siguiente. En el momento de ser usados fueron descongelados y sonicados por 15 seg con un sonicador Ultrasonics Cell Disruptor (150 W/cm<sup>2</sup>). La actividad de ALA-S fue determinada por un procedimiento colorimétrico. La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 2 ml, 100 umoles de buffer Tris-HCl (pH 7,4); 200 umoles de glicina; 10 umoles de ATP (neutralizado); 0,2 umoles de fosfato de piridoxal; 10 umoles de MgCl<sub>2</sub>; 10 umoles de EDTA; 5 umoles de succinil CoA y 0,5 ml de homogenato (aproximadamente 3,5 mg de proteínas). El succinil CoA fue sintetizado químicamente, en el momento de ser usado, según el método de Simon y Shemin (416), modificado por Zaman y col.(417). Las incubaciones fueron llevadas a cabo en un baño Dubnoff con agitación (60 oscilaciones/min) a 37°C durante 30 min. Luego de este tiempo, la reacción fue detenida por agregado de 0,5 ml de TCA 25%. El ácido 5-aminolevulínico formado fue convertido en el pirrol correspondiente y éste fue determinado, y corregido por la contaminación con aminocetona, de acuerdo al método de Granick (28).

Una unidad de ALA-S fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de ALA en 30 min a 37°C.

#### DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE FERROQUELATASA

Los hepatocitos fueron resuspendidos en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1) y homogeneizados en un Potter-Elvehjem con homogeinizador de teflón

(3x10 seg). Los homogenatos fueron congelados inmediatamente en un baño de acetona/hielo seco y guardados hasta el día siguiente a -20°C. La actividad de ferroquelatasa fue determinada por el mismo método empleado en mitocondrias de hígado de cerdo, utilizando un volumen de homogenato de 0,5 ml (aproximadamente 3,5 mg de proteínas) en cada mezcla de incubación.

Una unidad de ferroquelatasa fue definida como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de hemo en 90 min a 37°C.

#### DETERMINACION DEL CONTENIDO DE CITOCROMO P-450

La determinación del contenido de citocromo P-450 en hepatocitos aislados estuvo basada en el método descrito por Moldéus y col. (418). Para ello, en dos cubetas (muestra y referencia) se colocaron 2,5 ml de suspensión de hepatocitos en solución A, conteniendo aproximadamente  $0,5 \times 10^6$  células/ml. En la cubeta "muestra" se burbujó CO durante 90 seg y luego se agregaron 10 mg, aproximadamente, de ditionito de sodio a cada una de las cubetas. Inmediatamente después, se registró el espectro de diferencia entre 380 y 500 nm. La variación de absorbancia entre 450 y 490 nm fue considerada, utilizando el coeficiente de extinción de  $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  propuesto por Omura y Sato (419), para la cuantificación del contenido de citocromo P-450.

$$\text{nmoles citocromo P-450}/10^6 \text{ hepatocitos} = \frac{A_{450} - A_{490} \times 1000}{91 \times \frac{n_{\text{hepatocitos}}}{10^6}}$$

Fueron registrados espectros diferencia en distintas condiciones, según Estabrook y Werringloer (420), que permitieron la evaluación de la contaminación por oxihemoglobina y la contribución de citocromo b<sub>5</sub>.

#### Generación de CO

El CO fue obtenido en un generador, por reacción de formiato de sodio y ácido sulfúrico con calentamiento suave.

## RESULTADOS

I - PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FERRO- Y COBALTOQUELATASA  
DE HIGADO DE CERDO

## 1ª PARTE: PURIFICACION DE FERRO- Y COBALTOQUELATASA

### SOLUBILIZACION DE LA PROTEINA MITOCONDRIAL

Como una primera etapa para la purificación de ferro- y cobaltoquelatasa fueron ensayados distintos tratamientos, tendientes a lograr la solubilización de las actividades enzimáticas en estudio, que se encuentran en la membrana mitocondrial interna. Para ello, las mitocondrias lavadas fueron sometidas a congelamiento y descongelamiento y tratadas, después, con varios detergentes en diferentes concentraciones y durante distintos tiempos, como así también con agentes caotrópicos y sometidas a diferentes tiempos de sonicación.

Las concentraciones de detergentes que se indican son concentraciones finales durante el tratamiento. A menos que se indique lo contrario, el término control representa la fracción de mitocondrias congeladas y descongeladas.

#### Efecto de la sonicación

Como un primer intento para solubilizar las actividades enzimáticas, las mitocondrias fueron sonicadas durante diferentes tiempos (figura 1). La actividad de ferroquelatasa sufrió pocas alteraciones luego de la sonicación de las mitocondrias hasta 120 segundos, pero esta actividad enzimática fue completamente perdida cuando se sonicó a tiempos más largos. La actividad de cobaltoquelatasa disminuyó en forma paralela con respecto al control no sonicado, con cualquiera de los tiempos de sonicación probados. Después de 30 segundos de sonicación, el 95% de la proteína total fue solubilizada y este valor se mantuvo aproximadamente constante para todos los tiempos de sonicación ensayados.

#### Efecto del tratamiento con deoxicolato de sodio

El deoxicolato de sodio, un detergente aniónico, fue utilizado como agente solubilizante a diferentes concentraciones (figura 2). Los tratamientos realizados fueron de larga duración (el detergente en contacto con las mitocondrias durante 18 horas) y de corta duración (el detergente en contacto con las mitocondrias durante 1 hora). La acción del deoxicolato de sodio disminuyó significativamente la actividad de ferro- y cobaltoquelata-

sa durante el tratamiento prolongado, pero se observó una ligera activación luego del tratamiento de 1 hora con concentraciones bajas de detergente.

Las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa tratadas con 2 mg/ml de deoxicolato de sodio durante 1 ó 18 horas no fueron modificadas por una posterior sonicación de 30 segundos. Aproximadamente, el 95% de la proteína total fue solubilizada en los tratamientos con deoxicolato de sodio y este valor no fue modificado por una posterior sonicación de 30 segundos.

#### Efecto del tratamiento con Tween 20

El Tween 20 (monolaurato polioxietilensorbitano) fue otro de los detergentes utilizados para la solubilización de las proteínas mitocondriales. Las mitocondrias fueron tratadas con este agente surfactante, de características no iónicas, en concentraciones entre 10 y 50 mg/ml, durante 1 ó 18 horas (figura 3 A). Todos los tratamientos ensayados con este detergente inactivaron casi completamente la actividad de ferro- y cobaltoquelatasa. La sonicación durante 30 segundos, luego del tratamiento con 30 mg/ml de Tween 20 durante 1 ó 18 horas, no revirtió la pérdida total de ambas actividades enzimáticas.

Luego de 18 horas de los tratamientos, las proteínas mitocondriales fueron solubilizadas en forma creciente, con concentraciones crecientes de Tween 20, hasta un 100% de solubilización con 30 mg/ml de detergente. Por otra parte, luego de 1 hora de tratamiento, el 70% de la proteína total fue solubilizada con cualquiera de las concentraciones utilizadas de este surfactante; la sonicación por 30 segundos incrementó este valor al 100%.

#### Efecto del tratamiento con Lubrol PX

Los resultados obtenidos luego del tratamiento con Lubrol PX, un polioxietil éter, sobre las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa, se observan en la figura 3 B. Incrementos en las actividades de ferroquelatasa se obtuvieron con 20 mg/ml de Lubrol PX en tratamientos durante 1 ó 18 horas. Resultados que presentaban sólo ligeras diferencias, fueron obtenidos para la actividad de cobaltoquelatasa. Las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa disminuyeron cerca de un 30% por sonicación durante 30 segundos luego del tratamiento por 1 ó 18 horas con 20 mg/ml de detergente. Las proteínas solubilizadas, bajo cualquiera de los tratamientos con Lubrol PX, con o sin sonicación, fueron cerca del 85% de la proteína total presente.

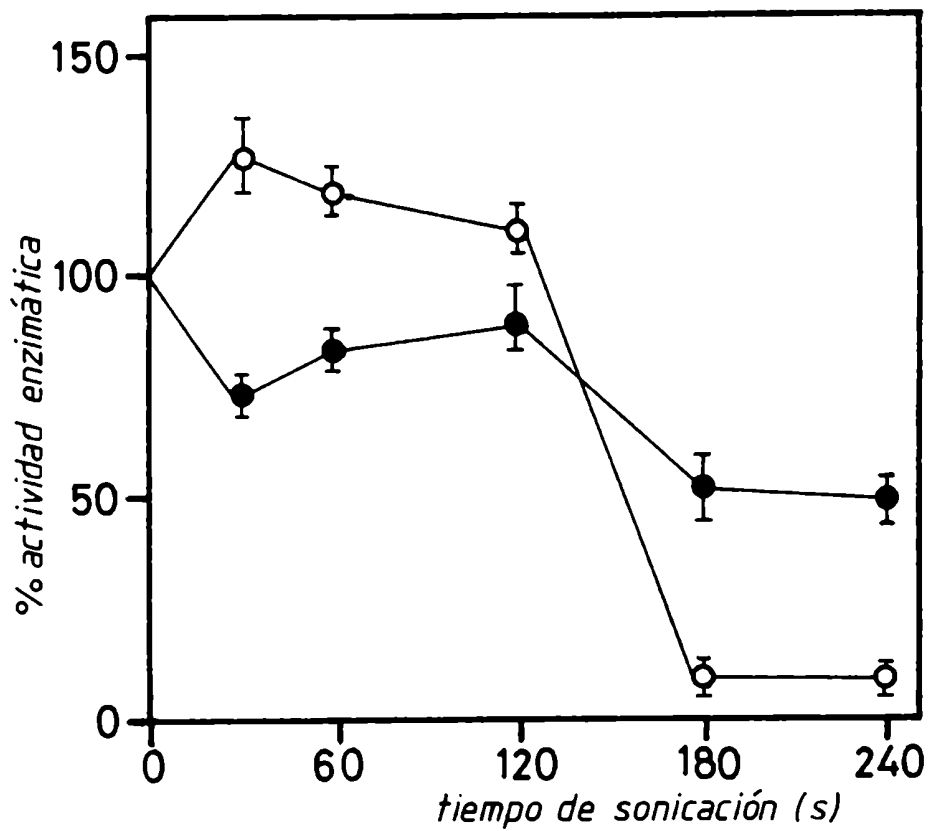


Figura 1: Efecto del tiempo de sonicación

Las mitocondrias fueron sonicadas durante los tiempos indicados y luego usadas como fuente de proteína enzimática. Los resultados están expresados como porcentajes respecto del control no sonicado. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de seis experimentos. Ferroquelatasa (○); Cobaltoquelatasa (●).

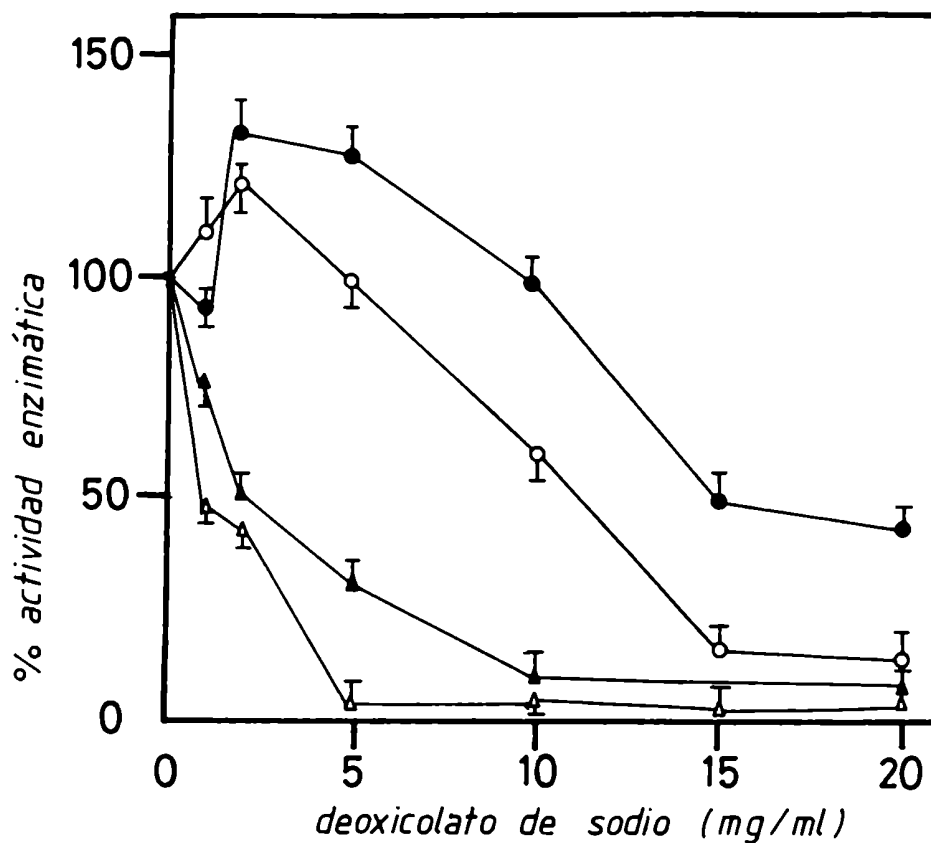


Figura 2: Efecto del deoxicolato de sodio

Las mitocondrias fueron tratadas con diferentes concentraciones de deoxicolato de sodio. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos. Ferroquelatasa, tratada durante 1 hora (○) y 18 horas (△). Cobaltoquelatasa, tratada durante 1 hora (●) y 18 horas (▲).



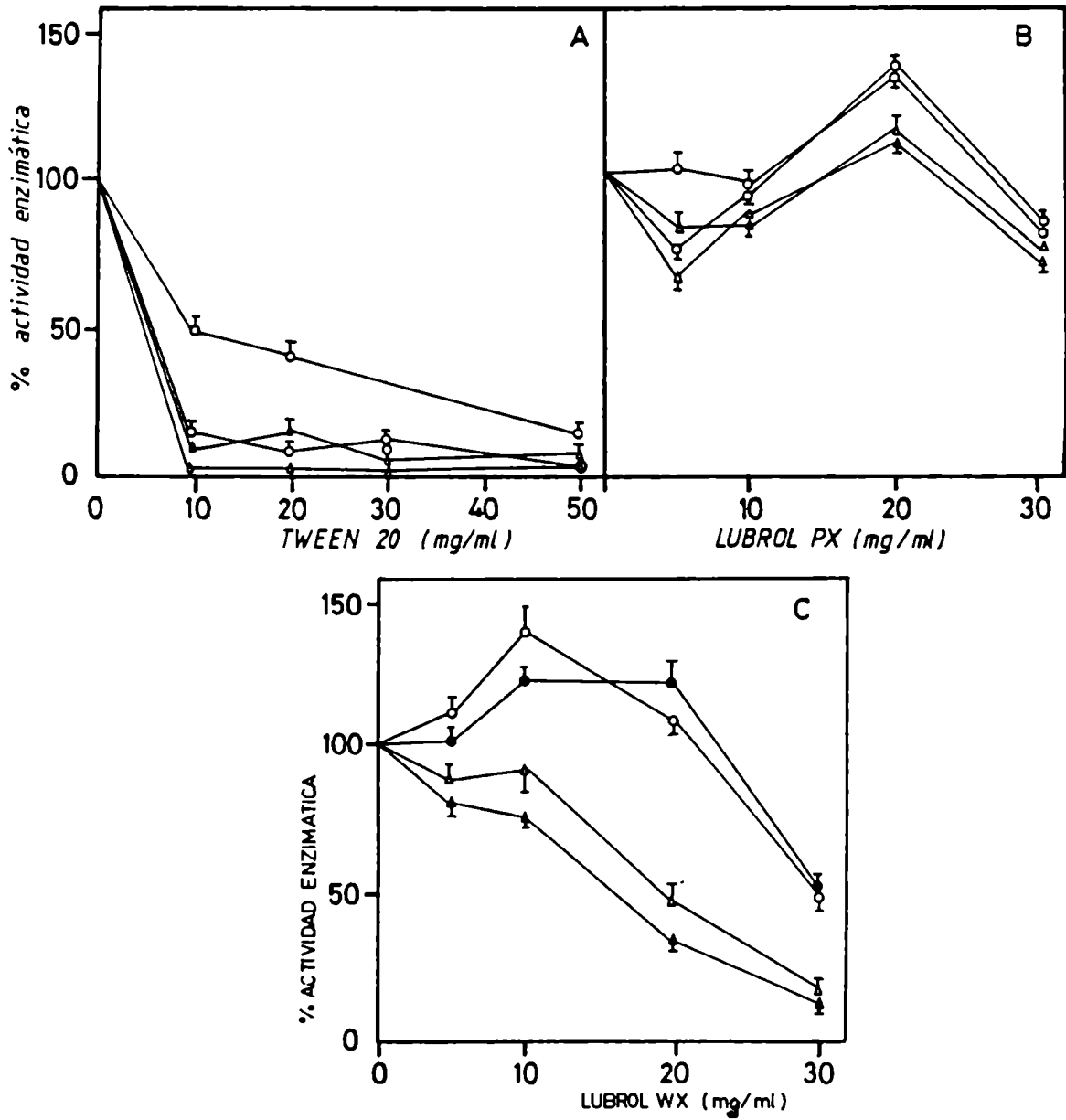


Figura 3: Efecto de distintos detergentes

Las mitocondrias fueron tratadas con diferentes concentraciones de Tween 20 (A), Lubrol PX (B) y Lubrol WX (C). Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados. Cada punto representa el pro-medio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos. Ferroquelatasa, tratada durante 1 hora (○) y 18 horas (△). Cobaltoquelatasa, tratada durante 1 hora (●) y 18 horas (▲).

### Efecto del tratamiento con Lubrol WX

Los tratamientos realizados con diferentes concentraciones de Lubrol WX, otro polioxietilen éter, causaron un aumento de la actividad de ferro y cobaltoquelatasa cuando este agente surfactante neutro se encontraba en una concentración de 10 mg/ml y durante un tratamiento de 1 hora. Los tratamientos prolongados ocasionaron una pérdida parcial de ambas actividades (figura 3 C). La sonicación durante 30 segundos, luego del tratamiento con Lubrol WX (10 mg/ml) durante 1 ó 18 horas, no modificó significativamente los resultados anteriores.

El 93% de la proteína total fue solubilizada cuando las mitocondrias fueron tratadas con 20 mg/ml de Lubrol WX durante 18 horas. Luego de 1 hora de tratamiento, cerca del 80% de la proteína total fue solubilizada a cualquier concentración de detergente utilizada. La sonicación durante 30 segundos, luego del tratamiento con Lubrol WX 10 mg/ml durante 1 hora, incrementó sólo ligeramente la proteína solubilizada.

### Efecto del tratamiento con Tritón X-100

El Tritón X-100, un detergente no iónico de la serie de los alquilfenoxipolietoxietanol, fue utilizado, a diferentes concentraciones y en tratamientos de 1 y 18 horas, como agente solubilizante de proteínas mitocondriales (figura 4). Los mejores resultados fueron obtenidos con 25 mg/ml de este detergente en un tratamiento de 18 horas, luego de las cuales se obtuvieron actividades de ferro- y cobaltoquelatasa cerca de 3 veces superiores a las obtenidas luego de congelar y descongelar las mitocondrias. Los tratamientos de 1 hora modificaron ligeramente las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa. La sonicación durante 30 segundos, luego de 1 ó 18 horas de tratamiento con 25 mg/ml de Tritón X-100, disminuyó la actividad de ferroquelatasa 50 y 70%, respectivamente, y la de cobaltoquelatasa en un 60% en ambos tratamientos.

Luego de 18 horas de tratamiento con 10 mg/ml de Tritón X-100 se solubilizaron cerca del 85% de las proteínas totales; la sonicación durante 30 segundos, luego de este tratamiento, incrementó la solubilidad a valores cercanos al 100%.

Cuando las mitocondrias, luego de ser congeladas y descongeladas, fueron centrifugadas a 20.000xg durante 30 min, el 45 y 55% de las unidades totales de ferro- y cobaltoquelatasa, respectivamente, quedaron en el precipitado y el resto se localizó en el sobrenadante. Resultados similares

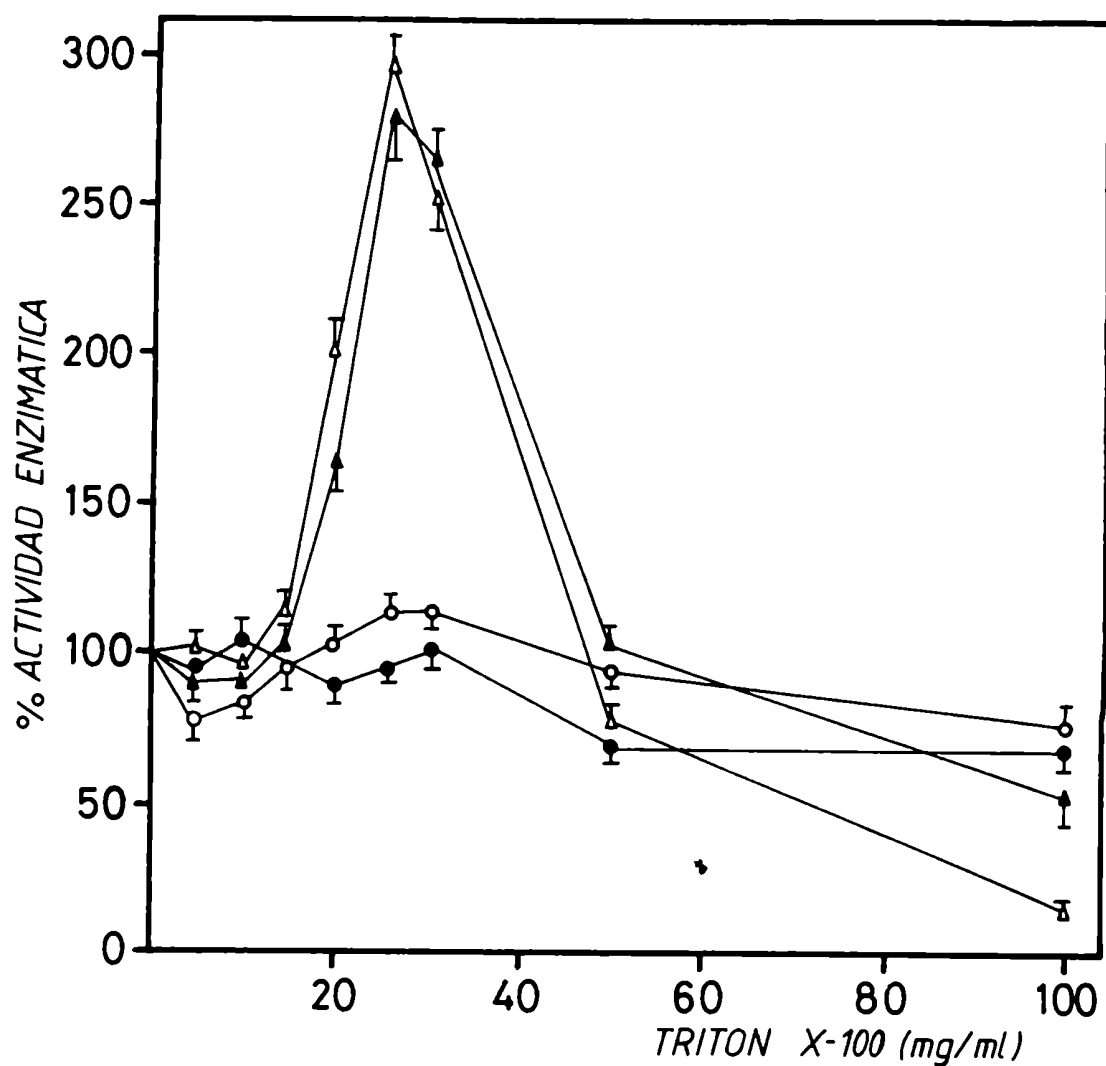


Figura 4: Efecto del tratamiento con Tritón X-100

Las mitocondrias fueron tratadas con diferentes concentraciones de Tritón X-100. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 6 experimentos. Ferroquelatasa, tratada durante 1 hora (O) y 18 horas ( $\Delta$ ); cobaltoquelatasa, tratada durante 1 hora ( $\bullet$ ) y 18 horas ( $\blacktriangle$ ).

fueron obtenidos luego de centrifugar a 105.000xg durante 1 hora. Las unidades totales de ambas actividades liberadas al sobrenadante en ambas centrifugaciones, luego del tratamiento con 25 mg/ml de Tritón X-100 durante 18 horas, correspondió a valores que representaron casi el triple de las unidades medidas en la mitocondria congelada y descongelada sin ningún otro tratamiento. No fueron detectadas actividades de ferro- y cobaltoquelatasa en los precipitados de 20.000xg y 105.000xg luego del tratamiento con el detergente.

#### Efecto del tratamiento con agentes caotrópicos

La solubilización de las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa de la membrana mitocondrial fue también ensayada por la acción de agentes caotrópicos, iones que favorecen la transferencia de grupos no polares al agua. En primer lugar se utilizó el KSCN, unasal que no compleja los iones ferrosos. El tratamiento fue realizado a 0°C durante 20 min con concentraciones finales del ión caotrópico entre 0,5 y 4 M. Luego de centrifugar a 20.000xg por 30 min, no fue posible detectar actividades de ferro- y cobaltoquelatasa en los sobrenadantes. Otro agente caotrópico, el NaClO<sub>4</sub>, fue utilizado para la solubilización de ferro- y cobaltoquelatasa, en las mismas condiciones experimentales empleadas para el KSCN. En los sobrenadantes resultantes de los tratamientos con NaClO<sub>4</sub> 0,5 y 1 M fue posible determinar actividad de ferro y cobaltoquelatasa, pero sólo 30 ó 35% superior a las de los controles.

#### PURIFICACION DE LA PROTEINA MITOCONDRIAL SOLUBILIZADA

Las actividades enzimáticas de ferro- y cobaltoquelatasa fueron solubilizadas tratando las mitocondrias, congeladas y descongeladas, con 25 mg/ml (2,5% p/v) de Tritón X-100 durante 18 horas; posteriormente fueron diluídas con un volumen igual de buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1) y centrifugadas a 20.000xg por 30 min. El sobrenadante resultante, que contenía las proteínas mitocondriales solubilizadas, presentó una actividad específica aproximadamente 3 veces superior, con respecto a las mitocondrias congeladas y descongeladas.

Posteriores intentos de purificación condujeron a la utilización de distintas técnicas, cuyos resultados se detallan a continuación. A menos

que se indique lo contrario, el término control se refiere a la fracción de mitocondrias congeladas y descongeladas.

#### Tratamiento con gel de fosfato de calcio

La fracción solubilizada con Tritón X-100 2,5% fue tratada con gel de fosfato de calcio en una relación de 2,5 mg de gel por miligramo de proteína. En la Tabla I se resumen los resultados obtenidos en las distintas fracciones. Las proteínas no adsorbidas por el gel no presentaron actividad de ferro- y cobaltoquelatasa. Del mismo modo, no fue detectada actividad de ferro- y cobaltoquelatasa en las fracciones proteicas eluidas del gel con concentraciones crecientes de buffer. Sólo un 63% de la proteína total adsorbida por el gel de fosfato fue eluida con la concentración mayor de buffer utilizada. Sin embargo, debido a que fuerzas iónicas mayores producían inhibición de ambas actividades enzimáticas, no fue posible lograr un porcentaje mayor de elución de las proteínas adsorbidas.

#### Precipitación diferencial por calentamiento a distintas temperaturas

La fracción solubilizada con Tritón X-100 fue sometida a precipitación de proteínas por calentamiento a distintas temperaturas durante distintos tiempos. Luego de eliminar las proteínas precipitadas, se determinó en el sobrenadante la actividad de ferro- y cobaltoquelatasa. El calentamiento a 60°C causó la pérdida casi total de ambas actividades enzimáticas aun en los tiempos más cortos (Tabla I). Luego de 5 minutos a 50°C sólo hubo un remanente en el sobrenadante del 56 y 65% de actividad de ferro- y cobaltoquelatasa, respectivamente, en relación a la actividad de la fracción solubilizada. A tiempos más largos, 10 ó 15 minutos, la actividad remanente fue algo menor en ambos casos (Tabla I).

#### Precipitación por cambio de pH

Las proteínas mitocondriales solubilizadas fueron llevadas a pH 5 con ácido acético glacial, eliminándose, luego de 10 min, las proteínas precipitadas por centrifugación a 10.000xg durante 10 min. No fue detectada actividad de ferro- y cobaltoquelatasa en el sobrenadante (Tabla I).

#### Diálisis

La enzima solubilizada fue dializada contra agua en una membrana de celulosa. El dializado presentó 2 fracciones, sobrenadante y precipitado

TABLA I: Tratamiento con gel de fosfato, calentamiento y pH 5

La fracción solubilizada con Tritón X-100 2,5% (p/v) fue tratada gel fosfato de calcio (2,5 mg gel/mg de proteína) a 4°C. Luego de centrifugar 10 min a 2.500xg, fue medida la actividad en el sobrenadante y en el precipitado eluido con buffer Tris-HCl en las concentraciones y pH indicados. Otra fracción de la enzima solubilizada fue calentada a distintas temperaturas durante los tiempos indicados, centrifugada a 15.000xg durante 15 min y determinada la actividad enzimática en los sobrenadantes. Otra fracción de la enzima solubilizada fue llevada a pH 5 a 4°C con ácido acético glacial, centrifugada a 15.000xg durante 15 minutos y determinada la actividad en el sobrenadante, previamente llevada a pH 8,1 con NaOH 1 M. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

<u>FRACCION</u>		<u>% ACTIVIDAD ESPECIFICA</u>	
		<u>FERROQUELATASA</u>	<u>COBALTOQUELATASA</u>
CONTROL		100	100
FRACCION SOLUBILIZADA		287 $\pm$ 21	293 $\pm$ 25
SOBRENADANTE GEL DE FOSFATO DE CALCIO		3 $\pm$ 1	7 $\pm$ 2
ELUIDO GEL TRIS-HCl 0,15 M (pH 8,1)		9 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1
ELUIDO GEL TRIS-HCl 0,20 M (pH 8,1)		0	0
CALENTAMIENTO A 50°C	5 min	140 $\pm$ 9	163 $\pm$ 12
	10 min	110 $\pm$ 8	135 $\pm$ 10
	15 min	113 $\pm$ 9	128 $\pm$ 7
CALENTAMIENTO A 60°C	5 min	16 $\pm$ 3	26 $\pm$ 3
	10 min	0	0
	15 min	0	0
SOBRENADANTE pH 5		0	0

midiéndose en ambas la actividad de ferro- y cobaltoquelatasa (Tabla II).

Ambas actividades enzimáticas presentaron en el sobrenadante del dializado, valores muy disminuidos respecto de los obtenidos en la fracción solubilizada, mientras que fue despreciable la actividad medida en el precipitado. La actividad de ferro- y cobaltoquelatasa fue nula en el líquido de contradiálisis.

#### Ultrafiltración

La fracción soluble fue ultrafiltrada a través de una membrana de celulosa con un poro de 12.000 D de límite, durante 6 horas (Tabla III). No fue detectada actividad de ferro- o cobaltoquelatasa en la fracción ultrafiltrada, mientras que el residuo conservó ambas actividades pero en niveles muy inferiores a los de la fracción solubilizada. Cuando se determinó actividad enzimática en el ultrafiltrado más el residuo en una relación 7:1 (v/v), los valores obtenidos fueron semejantes a los obtenidos con el residuo sólo, tanto para ferroquelatasa como para cobaltoquelatasa.

#### Fraccionamiento salino

La fracción de proteínas mitocondriales solubilizadas con Tritón X-100 2,5% (p/v) fue sometida a un fraccionamiento salino por adición de sulfato de amonio sólido hasta distintos porcentajes de saturación (figura 5). La fracción precipitada entre el 20 y 50% de saturación con dicha sal conservó el 71% y el 67% de la actividad total de ferro- y cobaltoquelatasa respectivamente. Además dicha fracción poseyó una actividad específica entre 3 y 4 veces superior a lo observado en la fracción solubilizada, tanto para ferroquelatasa como para cobaltoquelatasa.

#### Filtración molecular por Sephadex G-25

La fracción proteica precipitada entre 20 y 50% de saturación con sulfato de amonio fue resuspendida en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1) y sembrada en una columna de Sephadex G-25 (17 x 2)cm. La actividad específica de ferro- y cobaltoquelatasa, determinada en la fracción proteica eluida de esta columna, fue semejante a la observada en el precipitado del fraccionamiento salino entre 20-50% de saturación con sulfato de amonio.

Tabla II: Diálisis

La enzima solubilizada con Tritón X-100 2,5% fue dializada contra agua a 4°C en una membrana de celulosa Spectrapor 4, durante 24 horas. El dializado fue centrifugado a 20.000xg durante 30 min. Se determinó actividad enzimática en el sobrenadante y en el precipitado. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

<u>FRACCION</u>	<u>% ACTIVIDAD ESPECIFICA</u>	
	<u>FERROQUELATASA</u>	<u>COBALTOQUELATASA</u>
CONTROL	100	100
FRACCION SOLUBLE	287 $\pm$ 21	293 $\pm$ 25
SOBRENADANTE DIALIZADO	170 $\pm$ 18	185 $\pm$ 14
PRECIPITADO DIALIZADO	29 $\pm$ 3	25 $\pm$ 2
LIQUIDO CONTRADIALISIS	0	0

Tabla III: Ultrafiltración

La fracción solubilizada con Tritón X-100 2,5% fue ultrafiltrada a 4°C a través de una membrana de celulosa Spectrapor 4, durante 6 horas. Posteriormente, se midió actividad de ferro- y cobaltoquelatasa en el ultrafiltrado, en el residuo y en el residuo más ultrafiltrado (7:1 v/v). Los resultados están expresados en porcentajes respecto de controles y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

<u>FRACCION</u>	<u>% ACTIVIDAD ESPECIFICA</u>	
	<u>FERROQUELATASA</u>	<u>COBALTOQUELATASA</u>
CONTROL	100	100
FRACCION SOLUBLE	287 $\pm$ 21	293 $\pm$ 25
ULTRAFILTRADO	0	0
RESIDUO	134 $\pm$ 13	131 $\pm$ 14
ULTRAFILT. + RESIDUO	125 $\pm$ 10	140 $\pm$ 11



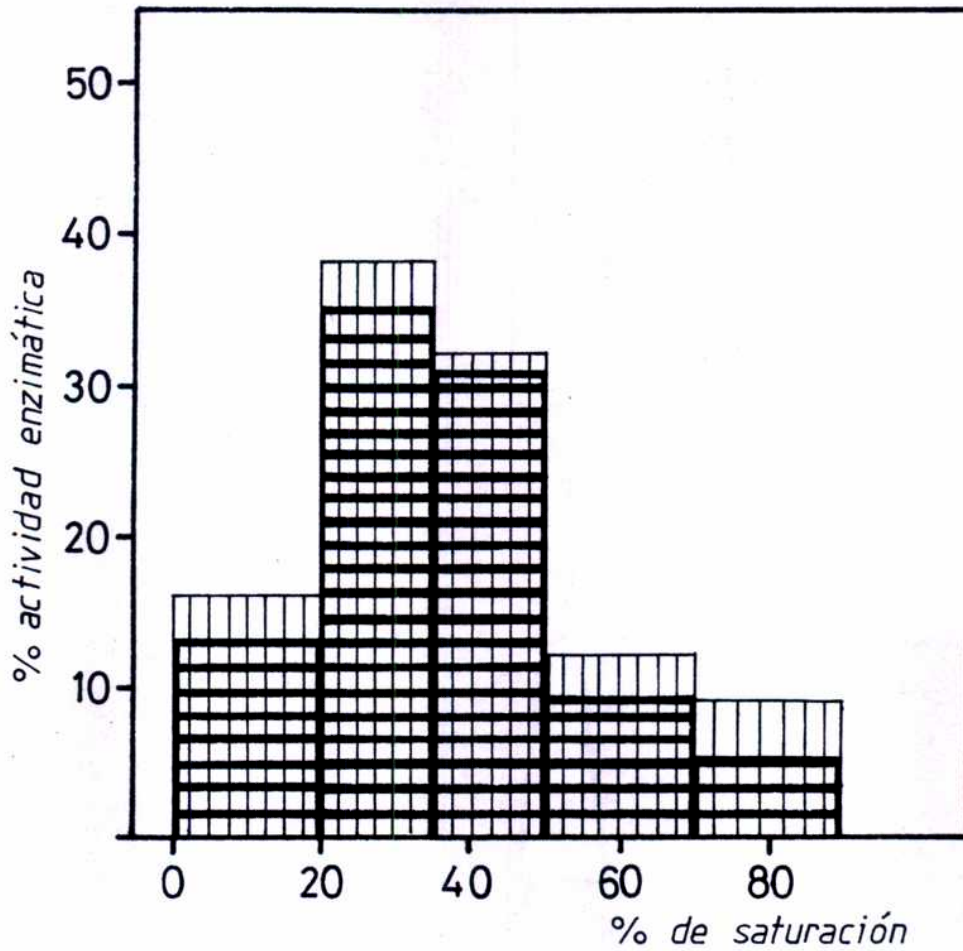


Figura 5: Fraccionamiento salino

La fracción solubilizada con Tritón X-100 2,5% fue precipitada con sulfato de amonio a 4°C en distintos porcentajes de saturación. La actividad de ferro- y cobaltoquelatasa fue medida en los distintos precipitados. Las barras representan el porcentaje de actividad en los precipitados con respecto a la actividad total de la fracción solubilizada.

### Filtración molecular por Sephadex G-200

Las proteínas precipitadas entre 20 y 50% de saturación con sulfato de amonio fueron resuspendidas en un pequeño volumen de Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1) y sembradas en una columna de Sephadex G-200. Cuando la elución de las proteínas en esta columna fue hecha con buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1) se obtuvieron varios picos, para cada una de las actividades enzimáticas, correspondientes a distintos volúmenes de elución. Sin embargo, ambas actividades enzimáticas fueron eluidos en una sola fracción, correspondiente al volumen muerto de la columna, cuando KCl 0,1 M fue agregado al buffer de elución.

En la figura 6 se representan los gráficos de elución de las proteínas y de las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa a través de la columna de Sephadex G-200.

### Filtración molecular por Sephacryl S-300

Debido a la falta de resolución de los picos con actividad de ferro- y cobaltoquelatasa en la columna de Sephadex G-200, se realizó una filtración molecular a través de Sephacryl S-300, para lograr un mayor rango de fraccionamiento. El precipitado de proteínas obtenido, luego de tratar la fracción mitocondrial solubilizada con sulfato de amonio entre 20 y 50% de saturación, fue suspendido y sembrado en una columna de Sephacryl S-300. La elución se realizó con buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1) conteniendo Tritón X-100 1% (p/v). Un perfil de elución típico se muestra en la figura 7 A. En ella se observa que ambas actividades enzimáticas eluyen en una misma fracción. Dicha fracción presentó actividades específicas de ferro-y cobaltoquelatasa entre 9 y 10 veces superior a las obtenidas con el fraccionamiento salino. De acuerdo a la curva de calibración representada en la figura 7 B, este pico correspondería a proteínas de un peso molecular aproximado de 240.000. La ausencia del detergente en el buffer de elución, si bien alteró parcialmente el perfil de elución de las proteínas, no modificó la ubicación del pico con actividad de ferro- y cobaltoquelatasa ni las actividades específicas correspondientes.

Para la caracterización enzimática se utilizó una fracción purificada proveniente de una columna eluida en ausencia de detergente.

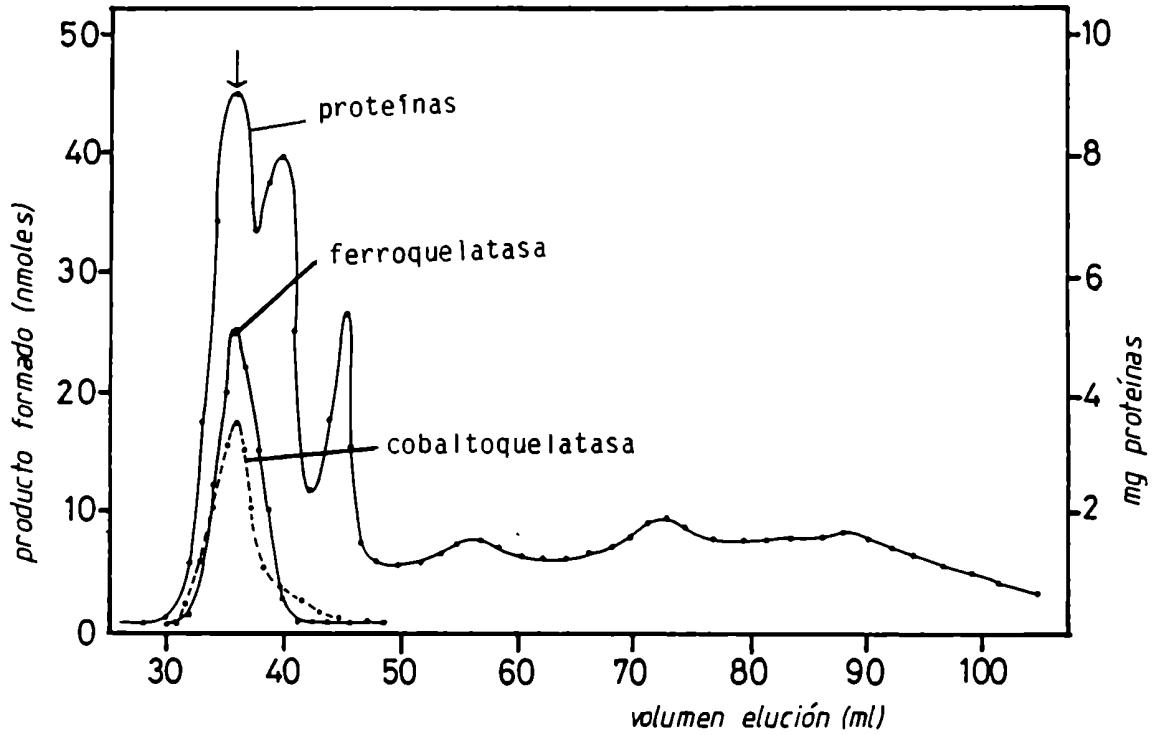


Figura 6: Filtración molecular por Sephadex G-200

Las proteínas precipitadas con sulfato de amonio entre 20 y 50% de saturación (aproximadamente 40 mg) fueron sembradas en una columna de Sephadex G-200 (58 x 1,6 cm), equilibrada previamente y eluida con buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1), y KCl 0,1 M. Con un flujo de 4 ml/cm<sup>2</sup> hora fueron recogidas las fracciones de 1,5 ml cada una. La cantidad de proteínas y la actividad de ferro- y cobaltoquelatasa fueron determinadas en cada una de las fracciones.

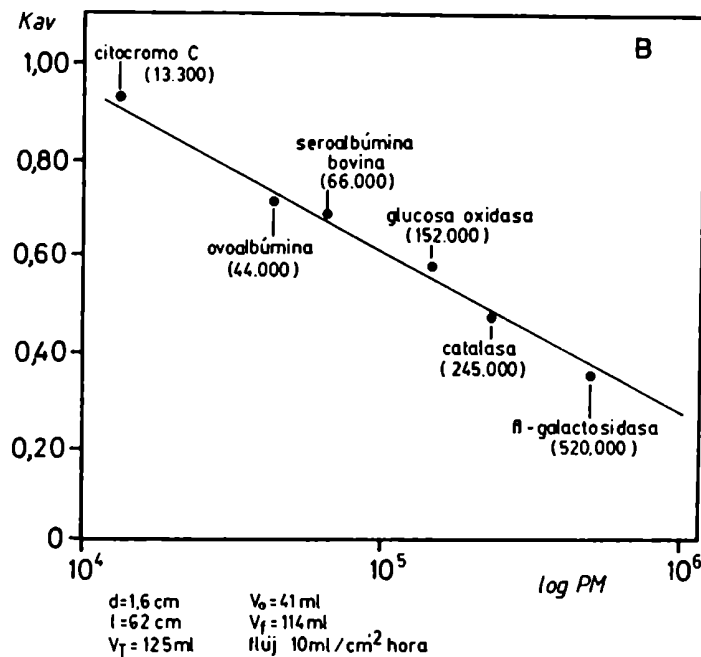
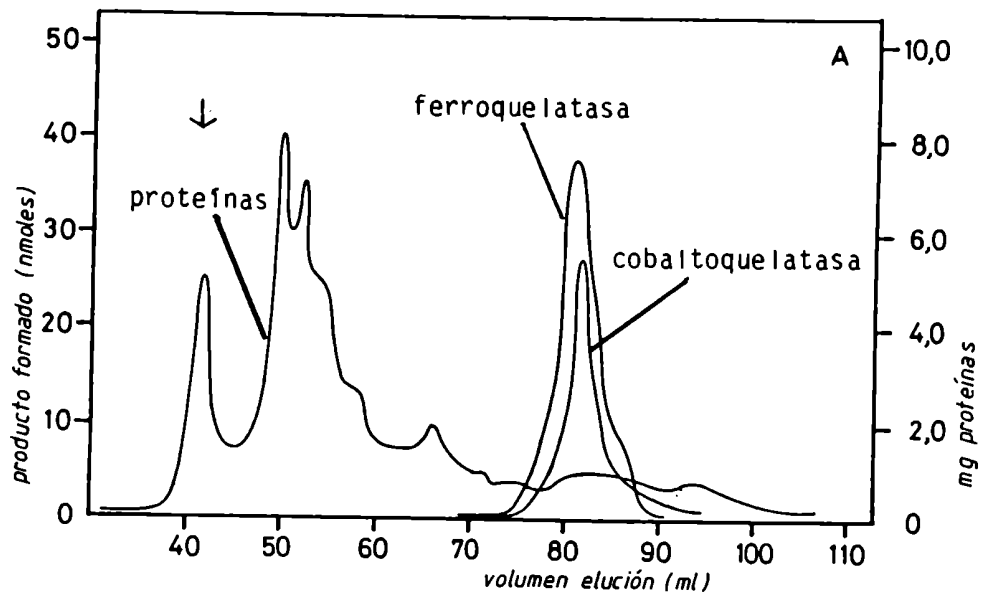


Figura 7: Filtración molecular por Sephacryl S-300

A) Las proteínas precipitadas con sulfato de amonio entre 20 y 50% de saturación (aproximadamente 35 mg) fueron sembradas en una columna de Sephacryl S-300 (62 x 1,6 cm) equilibrada previamente y eluida con buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1) y Tritón X-100 1%. El flujo de la columna fue de 10 ml/cm<sup>2</sup> hora y fueron recogidas fracciones de 1,5 ml cada una. La cantidad de proteínas y la actividad de ferro- y cobaltoquelatasa fueron determinadas en cada una de las fracciones. B) Curva de calibración de la columna de Sephacryl S-300. V<sub>0</sub> (volumen de elución del azul dextrano): 41 ml. Volumen de elución del CoCl<sub>2</sub>: 114 ml.

### ESQUEMA DE LA PURIFICACION DE FERRO- Y COBALTOQUELATASA

El esquema final de la purificación de ferro- y cobaltoquelatasa se describe en la Tabla IV. Ambas actividades enzimáticas presentaron similares grados de purificación, superior a las 400 veces, y con rendimientos cercanos al 30%. Dichos parámetros variaron en forma semejante a lo largo de los distintos pasos de purificación tanto para ferroquelatasa como para cobaltoquelatasa.

#### Pureza y estabilidad

La homogeneidad de la preparación enzimática eluída de la columna de Sephacryl S-300 fue determinada por una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Esta fracción dio una sola banda neta, aunque se observaron trazas de una banda, ligeramente teñida, correspondiente a un peso molecular de 66.000 aproximadamente (figura 8). La pureza de esta preparación fue estimada superior al 90%, de acuerdo a lo observado con la exposición del gel teñido en un densitómetro. La ferro- y cobaltoquelatasa purificada, en concentraciones de 130 ug/ml, fue estable por no más de 12 horas en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1), más allá de lo cual la actividad decayó rápidamente. Por otra parte, la estabilidad de las fracciones mitocondrial y solubilizada fue de varias semanas cuando fue guardada a -20°C.

Tabla IV: Cuadro de purificación de ferro- y cobaltoquelatasa de hígado de cerdo  
El procedimiento experimental se detalla en Materiales y Métodos

<u>FRACCION</u>	<u>PROT.</u> <u>TOTALES</u> <u>(mg)</u>	<u>FERROQUELATASA</u>			<u>COBALTOQUELATASA</u>				
		<u>ACT.</u> <u>(U/tot.)</u>	<u>A.ESP.</u> <u>(U/mg)</u>	<u>REND.</u> <u>%</u>	<u>PURIF.</u>	<u>ACT.</u> <u>(U/tot.)</u>	<u>A.ESP.</u> <u>(U/mg)</u>	<u>REND.</u> <u>%</u>	<u>PURIF.</u>
HOMOGENATO	1950	4095	2,1	100	1,0	5037	2,6	100	1,0
MITOCONDRIAS	365	3720	10,2	91	4,9	4390	12,0	87	4,6
FRAC. SOLUBLE	110	3220	29,3	79	14,0	3864	35,1	77	13,5
FRAC. SALINO	22,1	2278	103,5	56	49,3	2574	117,0	51	45,0
SEPHACRYL S-300	1,3	1270	976,9	31	465,2	1424	1095,4	28	421,0

## 2ª PARTE: CARACTERIZACION DE FERRO- Y COBALTOQUELATASA

### PESO MOLECULAR

Las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa fueron eluidas de una columna de Sephacryl S-300 con buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1) en una misma fracción, correspondiente a un peso molecular relativo de 240.000. Cuando la misma columna fue corrida con el mencionado buffer conteniendo Tritón X-100 1%, la fracción con actividad de ferro- y cobaltoquelatasa eluyó, así mismo, como una proteína correspondiente a 240.000 de peso molecular, de acuerdo a la calibración realizada en las nuevas condiciones (figura 7 A y B).

La proteína purificada, con actividad de ferro- y cobaltoquelatasa, dio una sola banda de peso molecular relativo de 40.000, cuando fue sometida a electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS, usando seroalbúmina bovina, ovoalbúmina y glicero-3-fosfato deshidrogenasa como proteínas marcadoras de peso molecular (figura 8).

### ESPECTRO DE ABSORCION

El espectro de absorción ultravioleta-visible de la enzima purificada se muestra en la figura 9. No hubo evidencias de la presencia de cofactores cromofóricos tales como hemo, piridoxal o flavinas en los espectros obtenidos de diferentes preparaciones enzimáticas.

### CURVA DE TIEMPO DE LA REACCION

La curva de tiempo de la reacción catalizada por ferro- y cobaltoquelatasa se representa en la figura 10. Cuando ferro- y cobaltoquelatasa fueron incubadas bajo atmósfera de nitrógeno, la formación de producto aumentó linealmente con el tiempo durante 2 horas de incubación. Cuando la actividad de ferroquelatasa fue determinada bajo condiciones aeróbicas, en presencia de glutatión, se obtuvo el 60% de la velocidad de reacción observada bajo atmósfera de nitrógeno.

En la misma figura 10 se observa que, cuando las mitocondrias congeladas y descongeladas, son utilizadas como preparación enzimática con actividad de ferroquelatasa, no hubo formación de hemo en los primeros 15 minutos de reacción, luego de lo cual la cantidad de hemo formado se incrementó linealmente con el tiempo. Sin embargo, la formación de cobaltomesoporfirina aumentó en forma lineal desde el comienzo de la incubación.

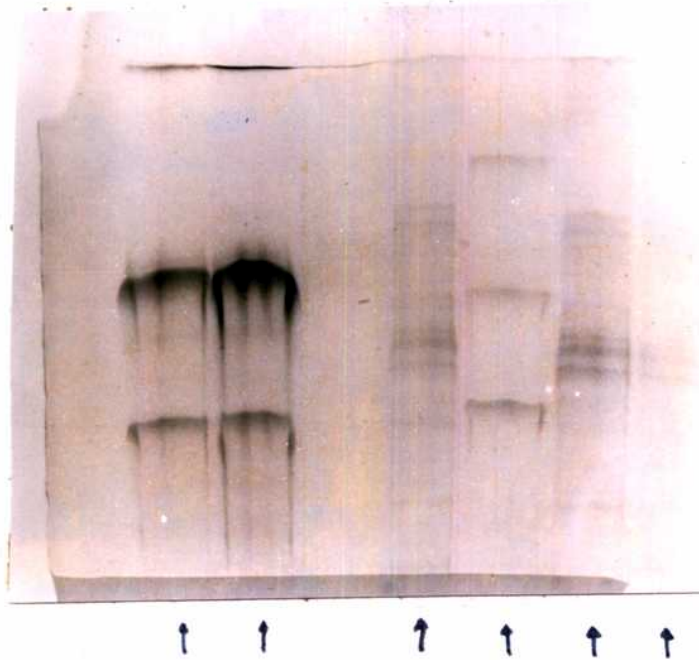


Figura 8: Electrotresis en gel de poliacrilamida con SDS

Muestras de cada una de las etapas del esquema de purificación de ferro- y cobaltoquelatasa fueron corridas en un gel de poliacrilamida 10% con SDS. De derecha a izquierda: mitocondrias congeladas y descongeladas, 100 ug; fracción solubilizada, 100 ug; marcadores de peso molecular (seroalbúmina bovina, 66.000; ovoalbúmina, 44.000; glícero 3-fostato deshidrogenasa, 36.000), 10 ug; fracción precipitada con sulfato de amonio 20-50%, 50 ug; fracción eluída de cromatografía en Sephacryl S-300 (2 calles), 10 ug.



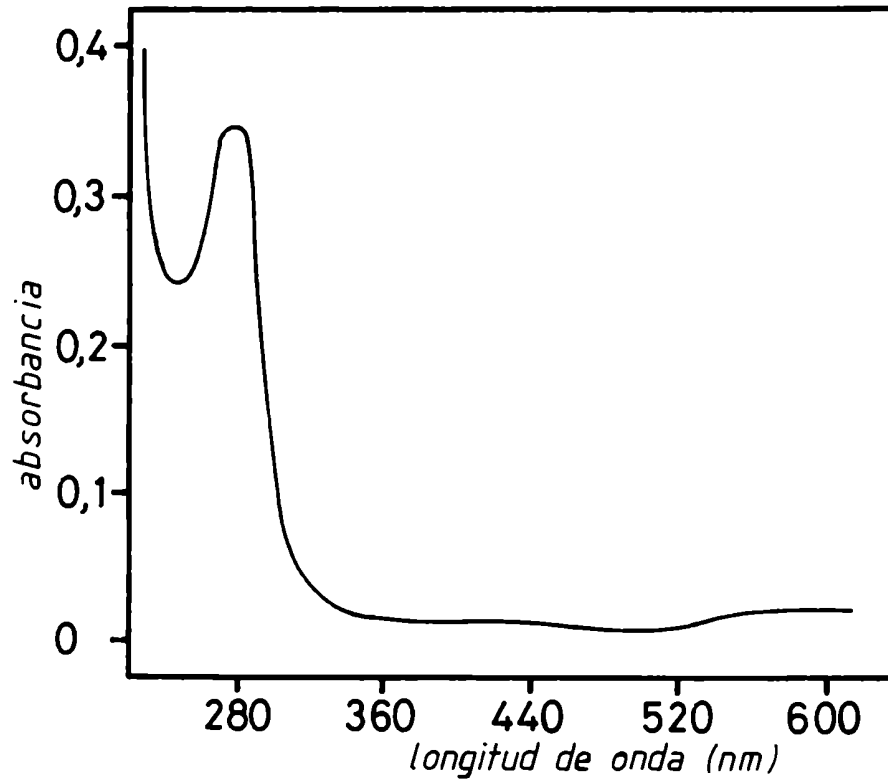


Figura 9: Espectro de absorción de la enzima purificada  
Espectro de absorción de la fracción eluida de Sephacryl S-300 (100 ug/ml)  
en buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,1).

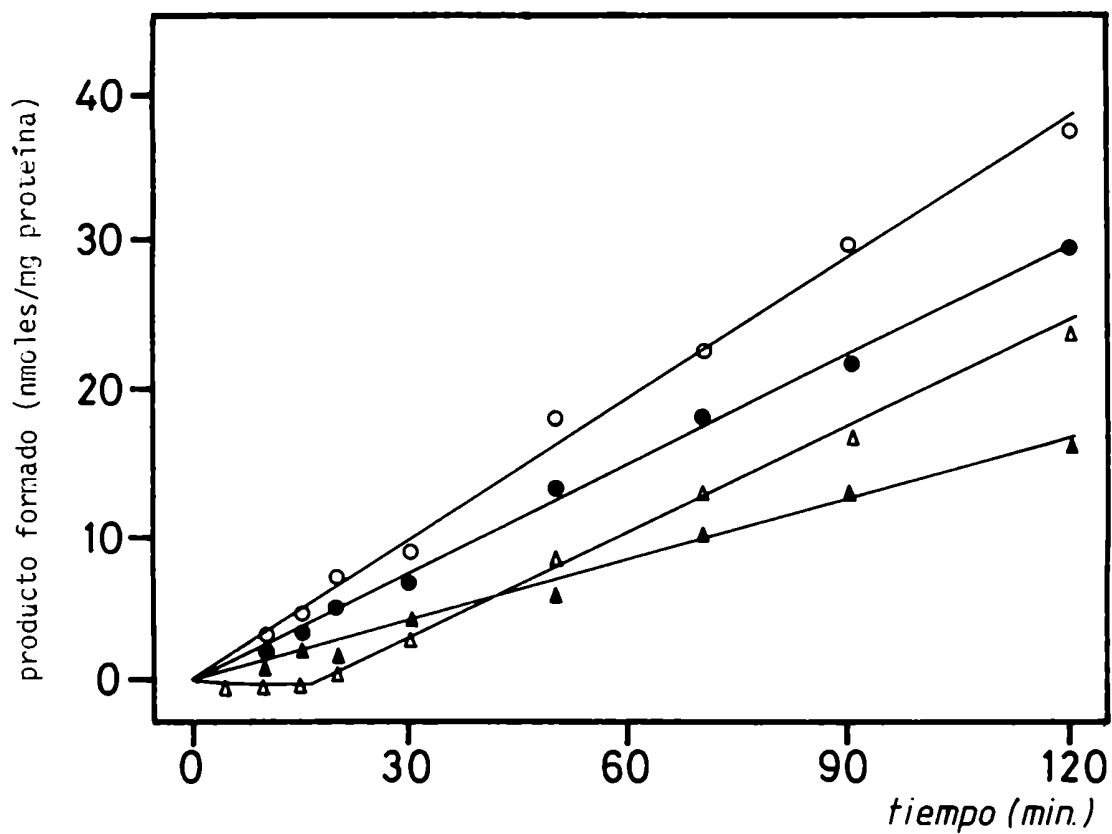


Figura 10: Curva de tiempo

Las actividades de ferroquelatasa (símbolos claros) y cobaltoquelatasa (símbolos oscuros) fueron determinadas a distintos tiempos, bajo atmósfera de  $N_2$  utilizando la tracción purificada (○●) o mitocondrias congeladas y descongeladas (Δ▲). Los resultados indican el promedio de 3 experimentos.

### EFEECTO DE LA CANTIDAD DE PROTEINAS

Los efectos de la variación de la cantidad de proteína purificada sobre la formación de producto se observan en la figura 11. Gráficos no lineales fueron obtenidos para las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa purificadas, con cantidades crecientes de proteínas, en un rango de 16 a 80  $\mu\text{g}$ .

### EFEECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La curva de actividad enzimática en función del pH (figura 12) muestra un pico único correspondiente al pH 8,1 para la óptima formación de ferro- y cobaltomesoporfirina. Cuando la proteína enzimática fue expuesta a los pH indicados por un corto tiempo y luego reajustados a pH 8,1, la actividad de ferro- y cobaltoquelatas no sufrió alteraciones.

### EFEECTO DE LA TEMPERATURA Y ENERGÍA DE ACTIVACION

Cuando la actividad enzimática de ferro- y cobaltoquelatasa fue determinada en la proteína purificada con temperaturas de incubación entre 25 y 63°C, la máxima formación de mesohemo y cobaltomesoporfirina, luego de 90 minutos, fue obtenida a 42°C (figura 13). En la figura 14 se representan las curvas obtenidas graficando el logaritmo de la velocidad inicial de la reacción, en función de la inversa de la temperatura utilizada en cada determinación. Para ambas actividades enzimáticas se obtuvieron rectas sin variación de pendiente. De la pendiente de estas rectas, de acuerdo a la ecuación de Arrhenius, se calculó la energía de activación para ambas reacciones, obteniéndose valores de  $15.881 \pm 1.493$  cal/mol y  $17.123 \pm 1.832$  cal/mol para las reacciones catalizadas por ferro- y cobaltoquelatasa, respectivamente. El factor de temperatura ( $Q_{10}$ ), que indica el incremento de la velocidad de reacción con un aumento de la temperatura de 10°C, fue de 2,37 para ferroquelatasa y 2,22 para cobaltoquelatasa.

### ESTUDIOS CINÉTICOS DE LAS REACCIONES

Los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  para mesoporfirina y para hierro(II) y cobalto(II), fueron calculados de los gráficos de Lineweaver-Burk (figura 15 A y B). Los resultados obtenidos para ferro- y cobaltoquelatasa se indican en la Tabla V.

### EFEECTO DE IONES METÁLICOS

Se estudiaron los efectos de diferentes iones metálicos sobre la

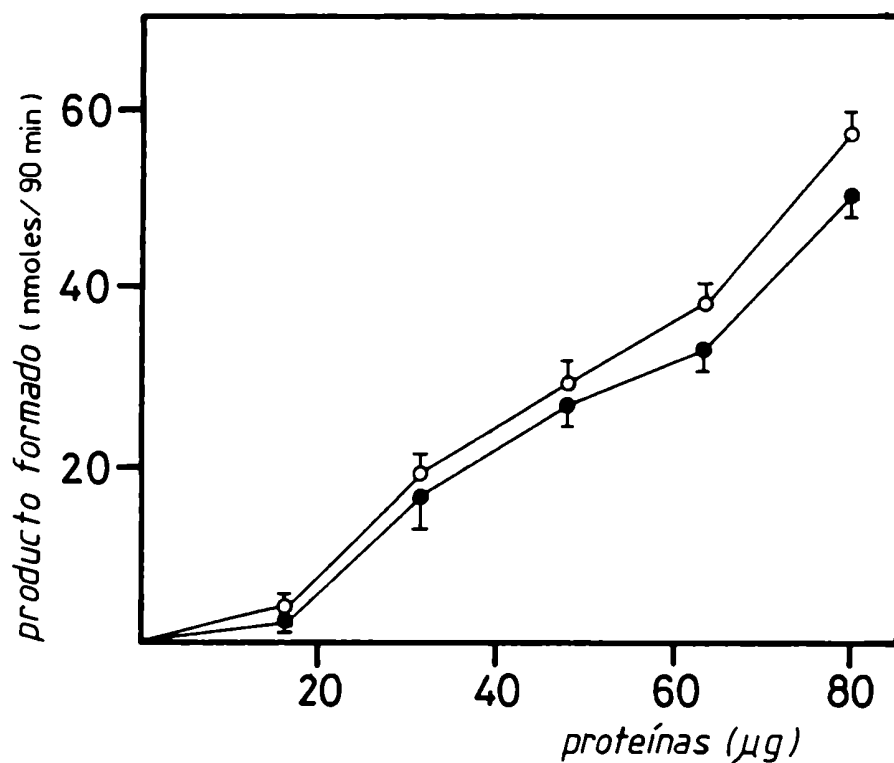


Figura 11: Curva de actividad enzimática en función de la cantidad de proteína. Las actividades de ferroquelatasa (○) y cobaltoquelatasa (●) fueron determinadas luego de 90 minutos de incubación con distintas cantidades de proteína enzimática purificada. Los resultados representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

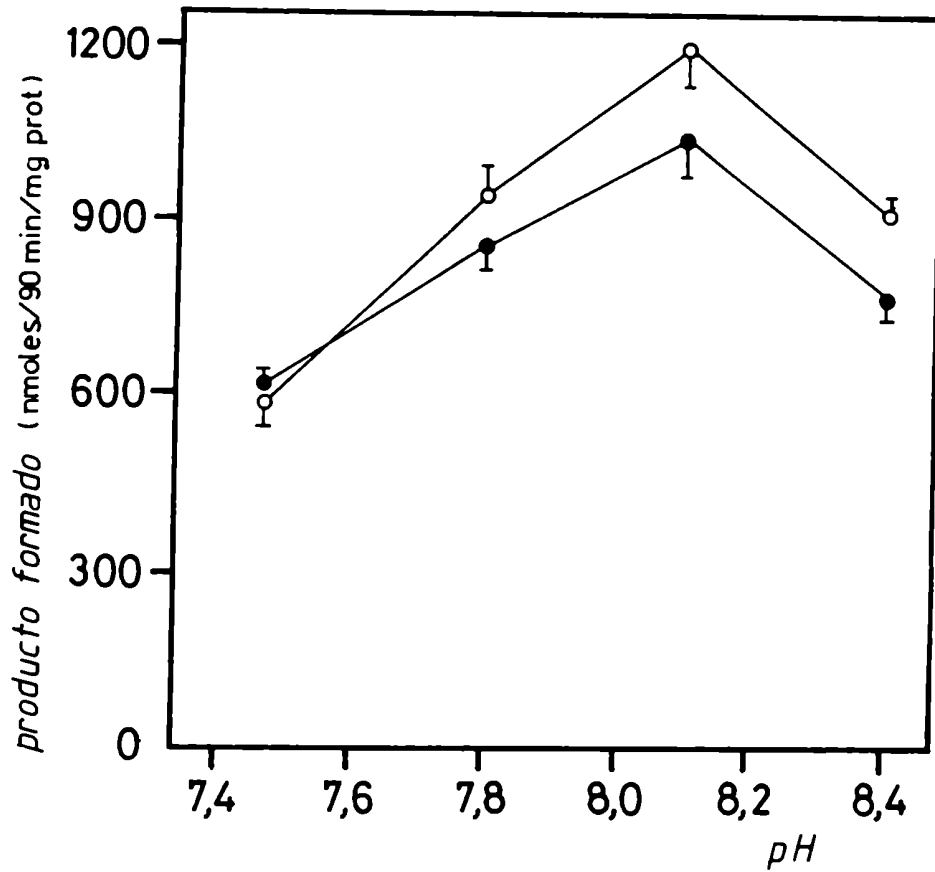


Figura 12: Curva de actividad enzimática en función del pH

Las actividades de ferroquelatasa (○) y cobaltoquelatasa (●) fueron determinadas luego de 90 minutos de incubación a distintos pH. Los resultados indican el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

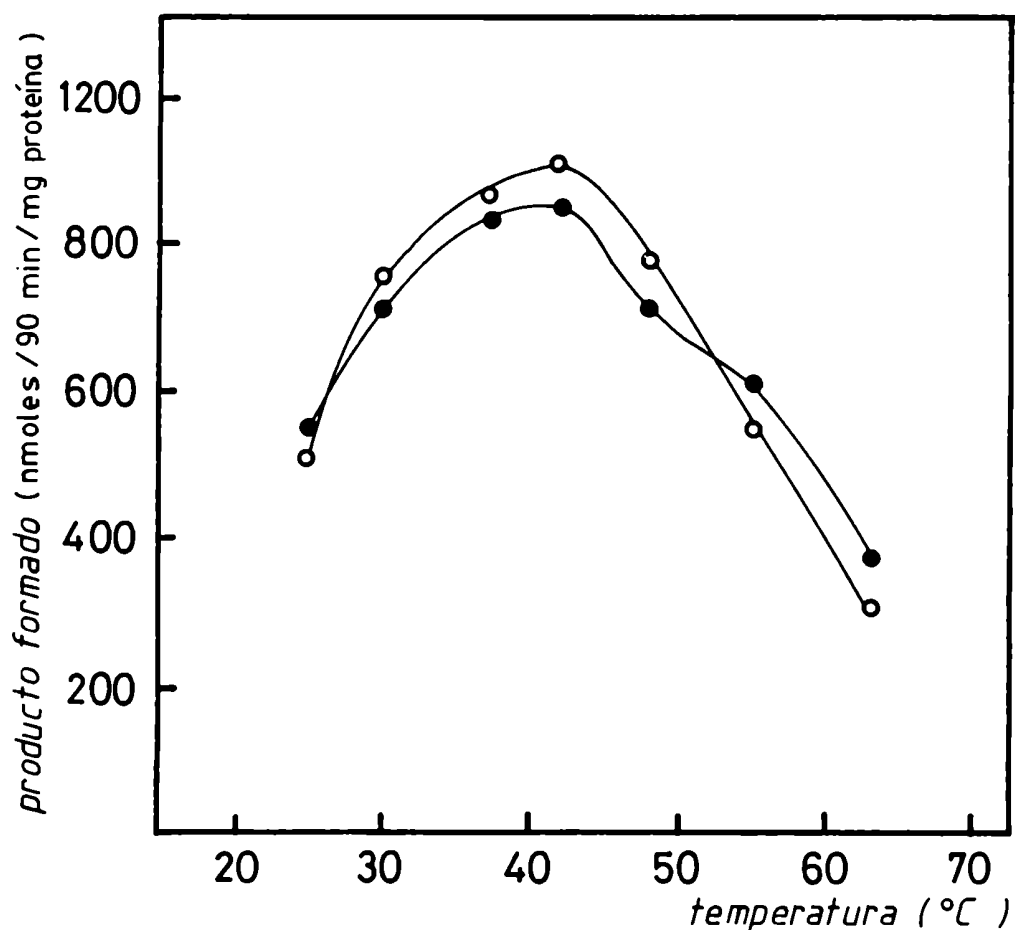


Figura 13: Curva de actividad enzimática en función de la temperatura  
Las actividades de ferroquelatasa (○) y cobaltoquelatasa (●) fueron determinadas luego de 90 minutos de incubación a distintas temperaturas. Los resultados indican el promedio de 3 experimentos.

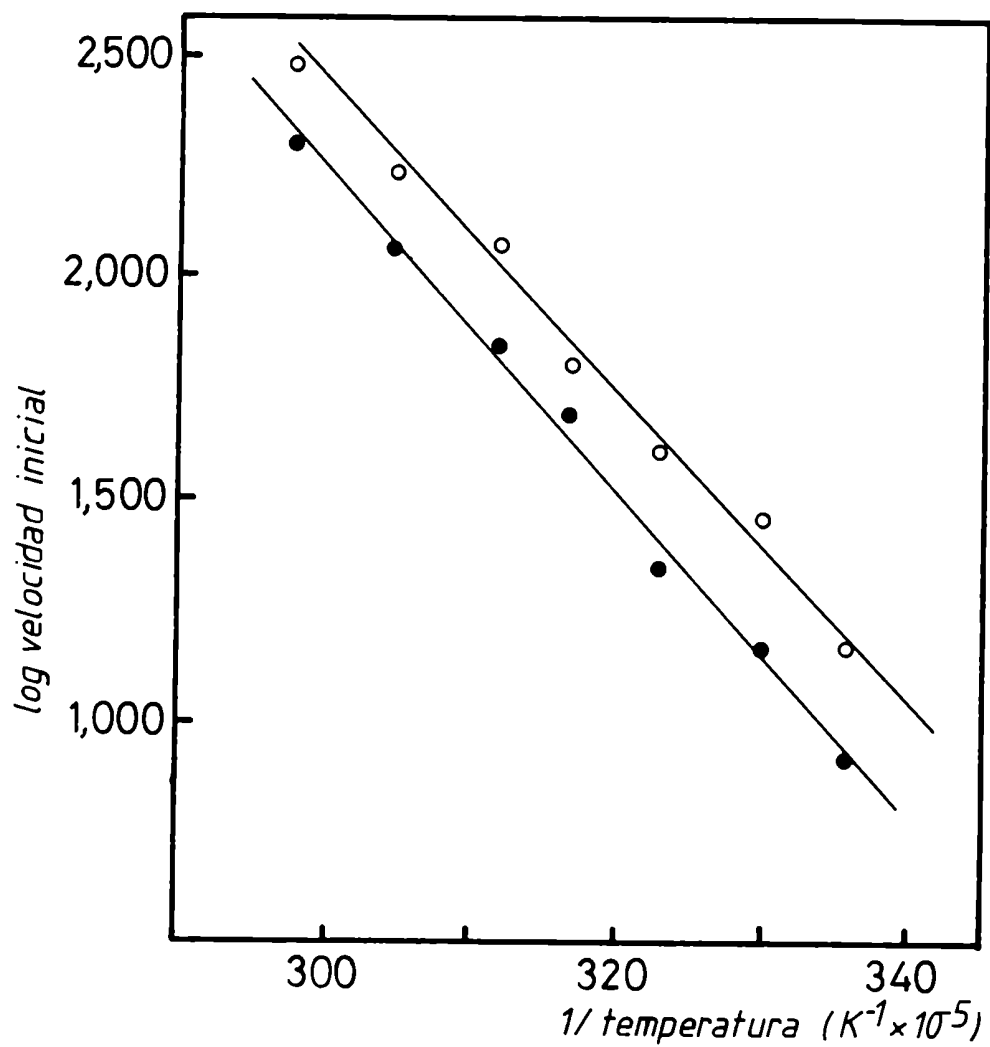
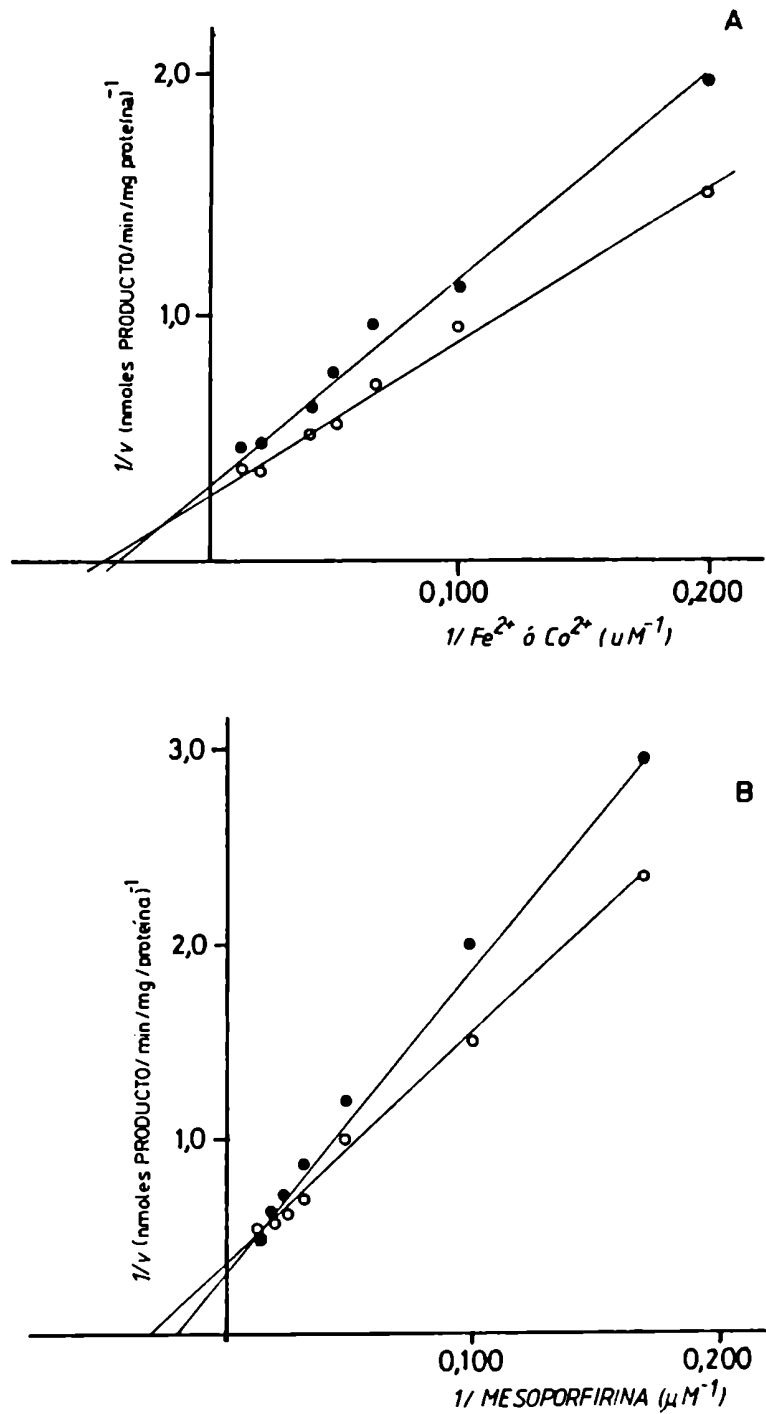


Figura 14: Gráfico de Arrhenius para las actividades de ferro (○) y cobalto-quelataza (●).  
Los resultados representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.



**Figura 15: Gráficos de Lineweaver-Burk**

Las actividades de ferroquelatasa (○) y cobaltoquelatasa (●) fueron determinadas con diferentes concentraciones de mesoporfirina (A) y con diferentes concentraciones del catión metálico correspondiente (B), manteniendo, en ambos casos, la concentración del otro sustrato constante. Los resultados representan el promedio de 3 experimentos.



Tabla V: Valores aparentes de  $K_m$  y  $V_{max}$  para ferro- y cobaltoquelatasa. Los resultados fueron obtenidos de los gráficos de Lineweaver-Burk correspondientes.

SUSTRATO VARIABLE	$K_m$ ( $\mu M$ )		VELOCIDAD MAXIMA (nmoles prod. $\text{min}^{-1}$ mg prot $^{-1}$ )	
	FERROQ.	COBALTOQ.	FERROQ.	COBALTOQ.
Fe(II)	23,3		9,8	
Co(II)		27,0		9,3
Mesoporfirina	30,3	45,5	8,9	9,1

Tabla VI: Efecto de cationes divalentes.

Diferentes cationes divalentes fueron agregados a la mezcla de incubación en las concentraciones finales indicadas. Los resultados están expresados como porcentajes de actividades respecto de la fracción purificada en incubaciones sin ningún agregado. Los resultados representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

CATION METALICO	CONCENTRACION ( $\mu M$ )	FERROQUELATASA % actividad	COBALTOQUELATASA % actividad
		100	100
Pb(II)	50	60 $\pm$ 5	55 $\pm$ 6
	250	20 $\pm$ 3	39 $\pm$ 2
Zn(II)	50	40 $\pm$ 4	31 $\pm$ 2
	250	4 $\pm$ 1	18 $\pm$ 2
Cu(II)	50	88 $\pm$ 6	100 $\pm$ 9
	250	48 $\pm$ 5	50 $\pm$ 2
Hg(II)	50	20 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2
	250	3 $\pm$ 1	0
Mg(II)	50	96 $\pm$ 8	100 $\pm$ 9
	250	99 $\pm$ 9	107 $\pm$ 7
Mn(II)	50	109 $\pm$ 7	120 $\pm$ 8
	250	136 $\pm$ 8	134 $\pm$ 10

actividad de ferro- y cobaltoquelatasa, presentándose los resultados obtenidos en la Tabla VI. En esta tabla puede observarse que Pb(II), Zn(II) y Cu(II) inhibieron parcialmente ambas actividades enzimáticas. La presencia de Hg(II) 250  $\mu$ M, inhibió totalmente la actividad de ferro- y cobaltoquelatasa. El Mg(II), en las condiciones ensayadas, no tuvo efecto sobre las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa, mientras que la presencia de Mn(II) en la mezcla de incubación, produjo una ligera activación de ambas actividades enzimáticas.

#### EFEECTO DE REACTIVOS DE GRUPOS SULFHIDRILICOS

Para estudiar el posible papel que pueden tener los grupos sulfhidrilos en la actividad de ferro- y cobaltoquelatasa, se determinaron ambas actividades en presencia de distintos reactivos, protectores y bloqueantes de grupos tioles (Tabla VII). La presencia de cisteína 1 mM aumentó las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa. Dichas actividades fueron inhibidas por la presencia de PCMB 1 mM, bloqueante de grupos tioles, siendo revertida totalmente esta inhibición, por la adición conjunta de cisteína 5 mM. Cistina 1 mM disminuyó a 84 y 62% las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa, respectivamente. Iodoacetamida, otro bloqueante de grupos sulfhidrilos, inhibió, en gran proporción, ambas actividades enzimáticas. El arsenito de sodio 1 mM produjo una fuerte inhibición, así como también el sulfito de sodio 1 mM. Este último, disminuyó drásticamente las actividades de ferro y cobaltoquelatasa.

#### PROTECCION POR SUSTRATOS DE LA INACTIVACION POR UN REACTIVO SULFHIDRILICO

Si los grupos sulfhidrilos están presentes y juegan un papel importante en el sitio activo de la ferro- y/o cobaltoquelatasa, la presencia de uno de los sustratos podría conducir a la protección de estos grupos de la inactivación por un agente bloqueante de tioles como la iodoacetamida. Los datos correspondientes a estos experimentos se muestran en la figura 16 A y B. Estos resultados demuestran claramente que las actividades de ferroy cobaltoquelasa fueron parcialmente protegidas de la inhibición causada por iodoacetamida 1 mM, por la preincubación simultánea con Fe(II) o Co(II) respectivamente, en una concentración final de 100  $\mu$ M. En la misma figura se observa que la mesoporfirina no ejerció efecto protector alguno.

Tabla VII: Efecto de reactivos de grupos sulfhidrilos sobre las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa

Diferentes sustancias fueron agregadas a las mezclas de incubación en las concentraciones finales indicadas. Los resultados están expresados como porcentajes de actividades respecto de la fracción purificada sin ningún agregado. Los resultados representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

REACTIVOS	FERROQUELATASA	COBALTOQUELATASA
	% actividad	% actividad
	100	100
Cisteína 1 mM	152 $\pm$ 12	124 $\pm$ 10
Cisteína 0,1 mM	110 $\pm$ 8	105 $\pm$ 7
PCMB 1 mM	26 $\pm$ 2	9 $\pm$ 1
Cisteína 1 mM + PCMB 1 mM	84 $\pm$ 6	71 $\pm$ 4
Cisteína 5 mM + PCMB 1 mM	110 $\pm$ 7	104 $\pm$ 6
Cisteína 1 mM	84 $\pm$ 5	62 $\pm$ 5
Iodoacetamida 1 mM	26 $\pm$ 3	38 $\pm$ 3
Arsenito de sodio 1 mM	21 $\pm$ 2	29 $\pm$ 2
Sulfito de sodio 1 mM	21 $\pm$ 2	15 $\pm$ 1

Tabla VIII: Efecto protector de sustratos contra la inactivación por calor

La enzima purificada fue preincubada a diferentes temperaturas y diferentes tiempos con las adiciones mencionadas. Cada sustrato fue agregado en la misma concentración usada en la mezcla de incubación para la determinación de actividad. Luego de la preincubación, fue determinada la actividad de ferro- y cobaltoquelatasa. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de la fracción purificada sin precalentamiento y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

ADICION PRECALENTAMIENTO	TIEMPO (min)	FERROQUELATASA		COBALTOQUELATASA	
		% actividad 48°C	% actividad 60°C	% actividad 48°C	% actividad 60°C
		100	100	100	100
Metal	5	20 $\pm$ 2	0	32 $\pm$ 2	0
	15	2 $\pm$ 1	0	5 $\pm$ 1	0
	5	106 $\pm$ 10	0	92 $\pm$ 7	0
	15	121 $\pm$ 9	0	101 $\pm$ 7	0
Mesoporfirina	5	23 $\pm$ 2	0	42 $\pm$ 3	0
	15	7 $\pm$ 1	0	11 $\pm$ 2	0

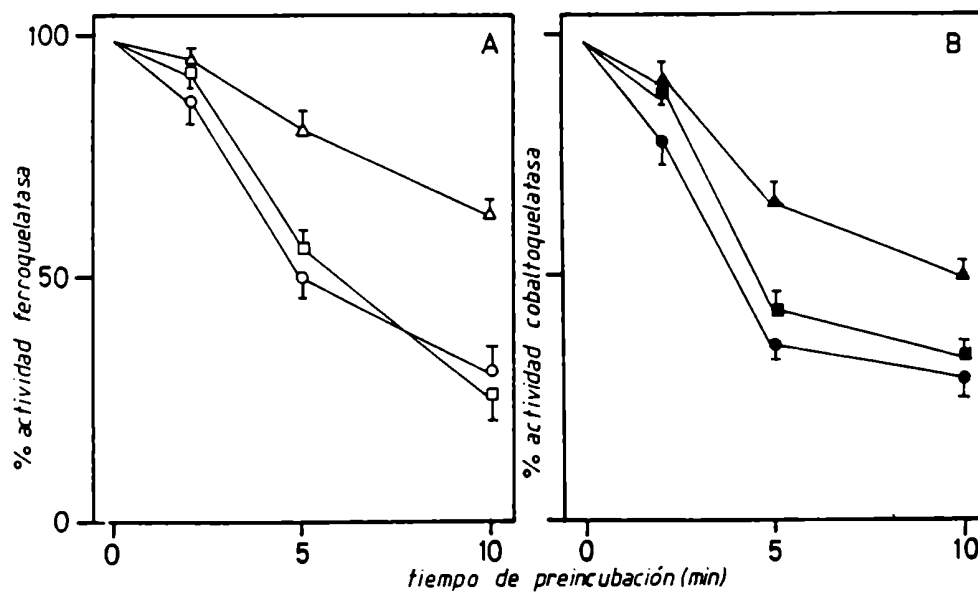


Figura 16: Efecto protector de sustratos contra la inactivación por iodoacetamida. La enzima purificada fue preincubada con iodoacetamida 1 mM durante los tiempos indicados, con las siguientes adiciones: ninguna (○ ●); cloruro de hierro(II), 100 uM (△); cloruro de cobalto(II), 100 uM (▲); mesoporfirina, 50 uM (◻); mesoporfirina, 100 uM (■). Se agregó, luego, glutatión 5 mM. Se determinaron las actividades de ferroquelatasa (A) y cobaltoquelatasa (B). Los resultados están expresados como porcentajes respecto de la fracción purificada, sin preincubación, y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos. Las concentraciones son finales en la mezcla de incubación.

### EFEECTO PROTECTOR DE LOS SUSTRATOS CONTRA LA INACTIVACION POR CALOR

El precalentamiento de la enzima purificada durante 5 minutos a 48°C destruyó parcialmente las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa, siendo completa cuando el precalentamiento se efectuó durante 15 minutos. Inactivación completa se obtuvo con precalentamientos a 60°C a cualquiera de los tiempos estudiados (Tabla VIII).

Cuando uno de los sustratos fue agregado durante el precalentamiento a 48°C, se observaron diferentes efectos. La presencia de Fe(II) o Co(II) durante el precalentamiento de 5 ó 15 minutos, protegió las actividades de ferroquelatasa o cobaltoquelatasa, respectivamente, de la inactivación por calor. La mesoporfirina no tuvo efecto protector alguno sobre ambas actividades enzimáticas (Tabla VIII). Con precalentamientos a 60°C no hubo protección contra la inactivación de ferro- y cobaltoquelatasa con ninguno de los sustratos.

### EFEECTO DE ACIDOS GRASOS, FOSFOLIPIDOS Y COLESTEROL

Se determinaron los efectos de la presencia de ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol sobre las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa. Los resultados de estos experimentos se indican en la Tabla IX. En primer lugar fueron probados varios ácidos grasos con distintos grados de insaturación. Puede observarse que el ácido oleico aumentó, ligeramente, la actividad de ferroquelatasa, mientras que los ácidos linoleico y linolénico estimularon significativamente ambas actividades enzimáticas.

Los tres fosfolípidos utilizados, que difieren en su parte polar, incrementaron, en forma similar, las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa. La presencia de colesterol en la mezcla de incubación no tuvo efecto sobre ambas actividades enzimáticas. Sin embargo, la presencia de colesterol junto con el ácido linoleico o fosfatidiletanolamina, anuló el efecto activador de los dos últimos sobre las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa.

Tabla IX: Efecto de ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol.

Diferentes ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol, en las concentraciones finales indicadas, fueron agregados a las mezclas de incubación, determinándose las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa. Los resultados están expresados como porcentajes de actividades respecto de la fracción purificada sin ninguna adición y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

<u>ADICION</u>	<u>FERROQUELATASA</u> % actividad	<u>COBALTOQUELATASA</u> % actividad
	100	100
Acido esteárico 10 mM	117 $\pm$ 9	105 $\pm$ 5
Acido oleico 10 mM	125 $\pm$ 10	109 $\pm$ 7
Acido linoleico 10 mM	185 $\pm$ 15	172 $\pm$ 12
Acido linolénico 10 mM	222 $\pm$ 19	190 $\pm$ 20
Dipalmitoilfosfatidilcolina 2 mM	185 $\pm$ 18	169 $\pm$ 15
Dipalmitoilfosfatidiletanolamina 2 mM	193 $\pm$ 15	177 $\pm$ 14
Dipalmitoilfosfatidilserina 2 mM	164 $\pm$ 16	178 $\pm$ 15
Colesterol 10 mg/ml	95 $\pm$ 7	106 $\pm$ 9
Colesterol 10 mg/ml + Acido linoleico 10 mM	84 $\pm$ 8	87 $\pm$ 5
Colesterol 10 mg/ml + Dipalmitoilfosfatidiletanolamina 2 mM	105 $\pm$ 5	100 $\pm$ 6

II - MECANISMOS DE REGULACION EN LA BIOSINTESIS DEL HEMO  
EN SUSENSIONES DE HEPATOCITOS DE RATA

## VIABILIDAD E INTEGRIDAD METABOLICA DE LOS HEPATOCITOS

### Observación microscópica

Los hepatocitos, obtenidos según se detalla en Materiales y métodos, se observaron bajo el microscopio óptico, encontrándose como unidades aisladas en su gran mayoría, aunque ocasionalmente estaban formando agrupaciones de 2 a 4 células. Los hepatocitos presentaron forma redondeada, de contornos bien definidos, color amarillento y apariencia refráctil. Las suspensiones obtenidas mostraron una fracción poco significativa de células no parenquimales y una pequeña contaminación con eritrocitos y otros tipos de células.

### Rendimiento y viabilidad celular

El método de aislamiento de células utilizado produjo un rendimiento de  $18,3 \pm 3,8 \times 10^6$  hepatocitos/gramo de hígado (promedio  $\pm$  E.S. de 16 preparaciones diferentes).

La viabilidad de las suspensiones de hepatocitos fue determinada por medición de la permeabilidad de las células al azul tripan y la liberación de la enzima láctico deshidrogenasa (LDH) (figura 17). La viabilidad inicial, considerada como el porcentaje de células que excluyen el azul tripan, fue del  $82 \pm 5\%$ ; luego de 6 horas de incubación a  $37^\circ\text{C}$ , el índice de viabilidad alcanzó el  $71 \pm 6\%$ , observándose un descenso aproximado menor al 2% de células viables por hora. La liberación de LDH al medio de suspensión fue del  $17 \pm 2\%$  al comienzo de la incubación y del  $26 \pm 3\%$ , luego de 6 horas. Los porcentajes representan el promedio  $\pm$  E.S. de 16 preparaciones diferentes.

### Integridad metabólica celular

La integridad metabólica de las suspensiones de células fue evaluada midiendo la capacidad glucogenolítica y de síntesis proteica de los hepatocitos. En la Tabla X, donde se resumen los resultados obtenidos, se observa que ambas funciones son mantenidas durante las 6 horas de incubación, dentro de los índices de viabilidad anteriormente indicados. Se observa también que la glucongenolisis, medida como liberación de glucosa al medio de incubación fue incrementada, aproximadamente un 100%, con el agregado, al medio de suspensión, de glucagon  $10^{-7}$  M.



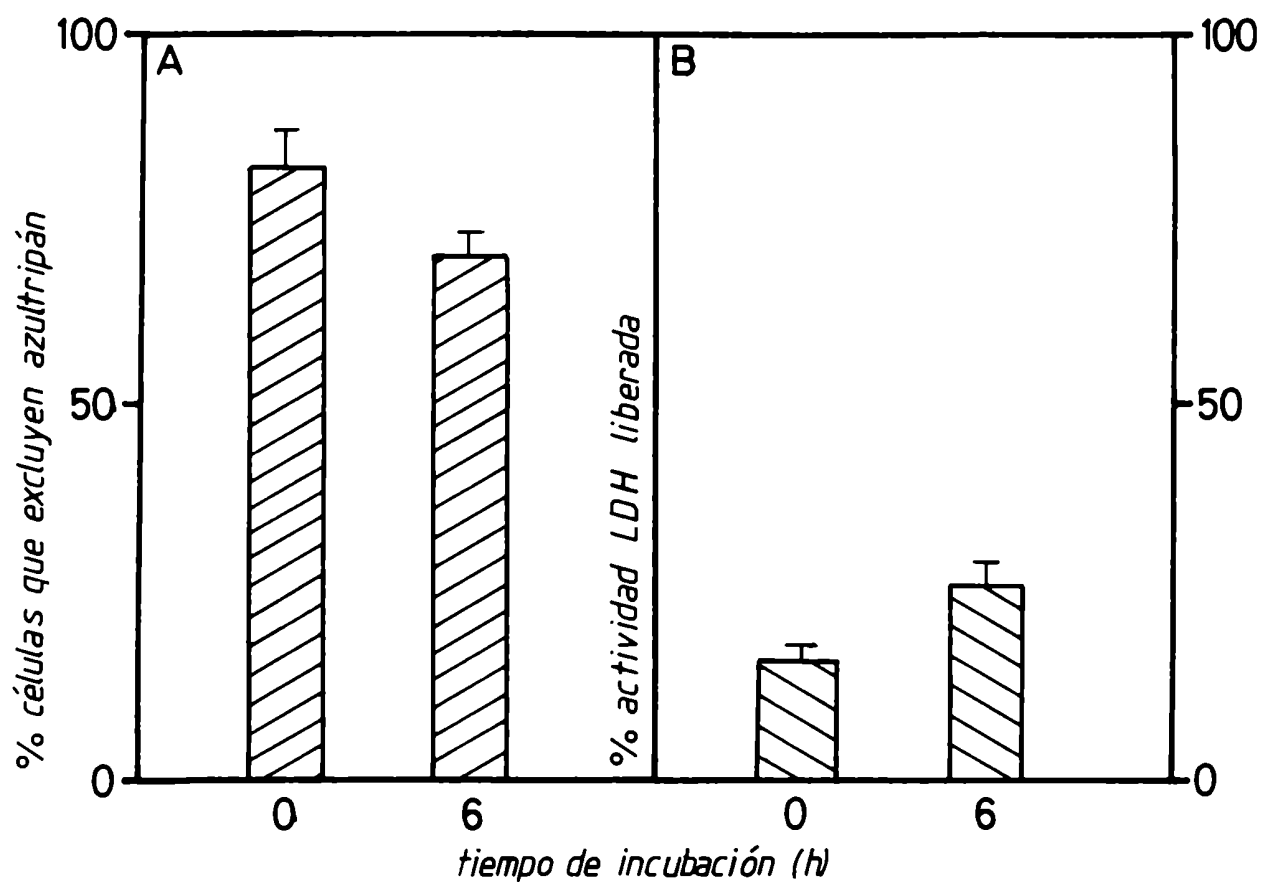


Figura 17: Determinación de la viabilidad celular

A: Porcentaje de hepatocitos que excluyen el azul tripan al comienzo y luego de 6 horas de incubación. B: Porcentaje de liberación de la enzima LDH al medio de incubación, al comienzo y luego de 6 horas de incubación. Los valores indicados por las barras representan el promedio de 12 determinaciones de diferentes preparaciones de hepatocitos. Las líneas verticales representan el error standard.

Tabla X: Determinación de la integridad metabólica celular  
 Los valores indicados representan el promedio  $\pm$  E.S. de 6 determinaciones con diferentes preparaciones de hepatocitos.

<u>TIEMPO DE INCUBACION</u> (Horas)	<u>GLUCOGENOLISIS</u> umoles glucosa/h/10 <sup>7</sup> hep.		<u>SINTESIS DE PROTEINAS</u> pmoles leu/h/mg prot.
	<u>Control</u>	<u>Glucagon 10<sup>-7</sup>M</u>	
0	2,1 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 0,7	8,8 $\pm$ 2,0
3	2,0 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 0,5	8,1 $\pm$ 1,4
6	1,7 $\pm$ 0,3	3,5 $\pm$ 0,5	7,8 $\pm$ 1,5

Tabla XI: Porcentaje de viabilidad de las suspensiones de hepatocitos frente a diferentes sustancias

Los valores representan el porcentaje de células que excluyen el azul tripan, en suspensiones conteniendo cada una de las sustancias mencionadas, al inicio y luego de seis horas del agregado. Los resultados representan el promedio de 3 determinaciones de diferentes preparaciones de hepatocitos.

<u>AGREGADO</u>	<u>0 H.</u>	<u>6 H.</u>	<u>AGREGADO</u>	<u>0 H.</u>	<u>6 H.</u>
AIA 1,2 mM	88	76	Fenobarbital 0,6 mM	84	78
Dibutiril AMPc 100 uM	79	75	Acetato de plomo 60 uM	75	64
Glucosa 100 mM	91	78	Maltosa 60 mM	83	69
Fructosa 60 mM	80	75	Piruvato 60 mM	84	70
Lactato 60 mM	87	74	Galactosa 60 mM	88	72
2-Deoxiglucosa 60 mM	76	69	Actinomicina 1 uM	80	73
Cicloheximida 10 uM	77	64	Adrenalina 20 uM	79	70
Forskolina 10 uM	89	76	Papaverina 15 uM	87	77
MIX 20 uM	82	71	Dibutiril GMPc 200 uM	84	74
Dibutiril UMPc 200 uM	83	75	AMP 200 uM	79	70
GMP 200 uM	80	69	Butirato de Na 200 uM	81	71
Imidazol 100 uM	80	71	Aloxano 100 uM	82	73

Efecto sobre la viabilidad de diversas sustancias agregadas al medio de incubación

Todas las sustancias incorporadas al medio de cultivo a lo largo de los experimentos realizados con suspensiones de hepatocitos, fueron controlados en su efecto sobre la viabilidad, considerada ésta como la permeabilidad del hepatocito al azul tripan (Tabla XI).

De los resultados expuestos en la Tabla XI se deduce que ninguna de las sustancias utilizadas en los experimentos altera la viabilidad de los hepatocitos, al menos durante las primeras 6 horas de incubación.

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE ENZIMAS DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO Y CONTENIDO DE CITOCROMO P-450 EN HEPATOCITOS DE RATAS NORMALES

Los niveles de actividad específica de las enzimas succinil CoA sintetasa, ALA-S, ALA-D y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450 fueron determinados en suspensiones de hepatocitos de ratas normales en condiciones basales. Los valores obtenidos al comienzo de la incubación (tiempo cero) se indican en la Tabla XII. Se indican también resultados obtenidos en hígado entero por otros autores.

Tabla XII: Actividades enzimáticas y contenido de citocromo P-450 en hepatocitos e hígado de ratas normales

Las actividades enzimáticas específicas y el contenido de citocromo P-450 fueron determinados en hepatocitos de ratas normales suspendidos en medio HAM F12 sin glucosa, según se indica en Materiales y métodos. Las unidades están definidas en la misma sección. Los resultados representan el promedio  $\pm$  E.S. de (\*), ocho experimentos y (\*\*), seis experimentos.

<u>MEDICION</u>	<u>HEPATOCITOS</u>	<u>HIGADO ENTERO</u>
Succinil CoA sintetasa (U/mg prot.)	51 $\pm$ 5**	---
ALA-S (U/mg prot.)	0,54 $\pm$ 0,06*	0,28 (421)
ALA-D (U/mg prot.)	4,33 $\pm$ 0,44**	4,78 (422)
Ferroquelatasa (U/mg prot.)	1,44 $\pm$ 0,11*	1,73 (422)
Citocromo P-450 (nmoles/10 <sup>6</sup> hep.)	0,25 $\pm$ 0,02*	0,23 (407)

Luego de 6 horas de incubación en condiciones basales, las actividades específicas de las enzimas se mantuvieron aproximadamente constantes, sin variaciones significativas. Por otra parte, el contenido de citocromo P-450 fue disminuyendo a lo largo de la incubación en condiciones basales, observándose una pérdida del 65% de la hemoproteína, luego de 6 horas (figura 18 A y B).

### EXPERIMENTOS DE INDUCCION CON DROGAS PORFIRINOGENICAS

#### Efecto de Alilisopropilacetamida (AIA)

Suspensiones de hepatocitos de rata fueron incubadas con distintas concentraciones de AIA. Las actividades de succinil CoA sintetasa, ALA-S, ALA-D y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450 fueron determinados a distintos tiempos y con cada una de las concentraciones ensayadas.

AIA produjo un aumento en las actividades de ALA-S y ferroquelatasa que fue dependiente de la concentración de dicha droga agregada al medio de suspensión, obteniéndose el máximo incremento con una concentración final de 1,2 mM (figura 18 A). Las curvas de actividad enzimática en función del tiempo, representadas en la figura 18 B, indican que este incremento fue observado 2 horas después de la adición de AIA 1,2 mM y llegó a duplicar los valores controles, para ambas actividades enzimáticas, luego de 5 horas de incubación.

Las actividades de succinil CoA sintetasa y ALA-D no fueron modificadas por la presencia de AIA durante 6 horas de incubación con cualquiera de las concentraciones utilizadas.

El efecto de AIA sobre el contenido de citocromo P-450 fue estudiado en las mismas condiciones. En la figura 18 A puede observarse que, concentraciones de AIA tan bajas como 0,8 mM, causaron una disminución del contenido de citocromo P-450 luego de 2 horas de incubación. En la curva de tiempo (figura 18 B) se observa que el descenso en el contenido de citocromo P-450, producido por el agregado de AIA 1,2 mM al medio de suspensión, fue muy marcado en las primeras 2 horas de incubación; posteriormente, la curva adopta la misma pendiente de la curva correspondiente a la de los controles sin AIA.

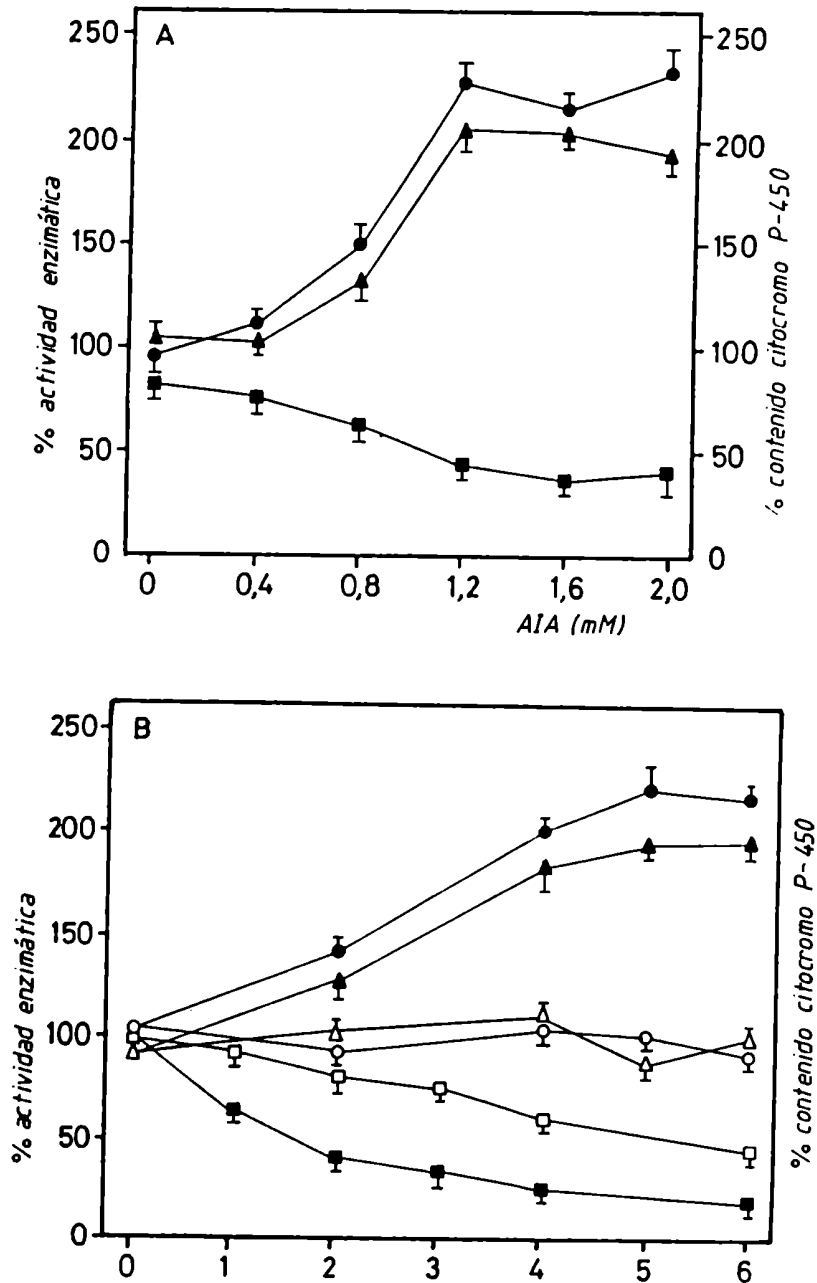


Figura 18: Efecto de AIA sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450

A) Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas con distintas concentraciones de AIA. fueron determinadas las actividades de ALA-S (●) y ferroquelatasa (▲), luego de 5 horas de incubación, y el contenido de citocromo P-450 (■), luego de 2 horas de incubación. B) Suspensiones de hepatocitos fueron incubados con (símbolos oscuros) y sin (símbolos claros) agregado de AIA 1,2 mM. Las actividades de ALA-S (●○) y ferroquelatasa (▲△) y el contenido de citocromo P-450 (■□) fueron determinados a distintos tiempos. En todos los casos los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 5 experimentos.

### Efecto del Fenobarbital

Los efectos del fenobarbital, en concentraciones entre 0,2 y 0,8 mM, sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa fueron estudiados a diferentes tiempos. Luego de 4 horas del agregado de fenobarbital, las actividades de ambas enzimas fueron significativamente aumentadas, obteniéndose incrementos máximos de ALA-S y ferroquelatasa con concentraciones de fenobarbital de 0,6 y 0,8 mM y entre 0,4 y 0,8 mM, respectivamente (figura 19 A). Las curvas de tiempo de las inducciones de ambas enzimas con 0,6 mM de fenobarbital están representadas en la figura 19 B. Luego de 4 horas de incubación, las actividades enzimáticas llegaron a un máximo que representa un incremento de aproximadamente 2,2 veces para ALA-S y 2,5 veces para ferroquelatasa.

Las actividades de succinil CoA sintetasa y ALA-D en hepatocitos fueron determinadas en las mismas condiciones que las anteriores. Ninguna de las concentraciones de fenobarbital utilizadas modificó significativamente las actividades de estas enzimas entre 0 y 6 horas de incubación.

El contenido de citocromo P-450 fue medido simultáneamente en hepatocitos enteros en presencia y en ausencia de fenobarbital. En la figura 19 A se observa que el contenido de citocromo P-450 fue incrementado con concentraciones crecientes de fenobarbital, en un efecto dosis-dependiente, siendo las concentraciones óptimas de fenobarbital, en este caso, de 0,4 y 0,6 mM. La curva de tiempo correspondiente a la acción de fenobarbital 0,6 mM sobre el contenido de citocromo P-450 (figura 19 C), permite observar que la presencia de dicha droga no sólo impidió la disminución del contenido basal de la hemoproteína, durante las primeras 4 horas de incubación, sino que produjo un aumento de alrededor de un 30% luego de 2 horas de la adición del barbitúrico a la suspensión de hepatocitos.

### Efecto del plomo

En la figura 20 se representan las curvas de actividad de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450 en respuesta al agregado de distintas concentraciones de acetato de plomo(II) y en función del tiempo. La actividad de ALA-S fue incrementada con concentraciones crecientes de acetato de plomo, mientras que la actividad de ferroquelatasa disminuyó en el mismo rango de concentraciones (figura 20 A). La actividad de ALA-S aumentó rápidamente entre las 2 y 4 horas de incubación por la adición, a la suspensión de hepatocitos, de acetato de plomo 60 uM, obteniéndose un

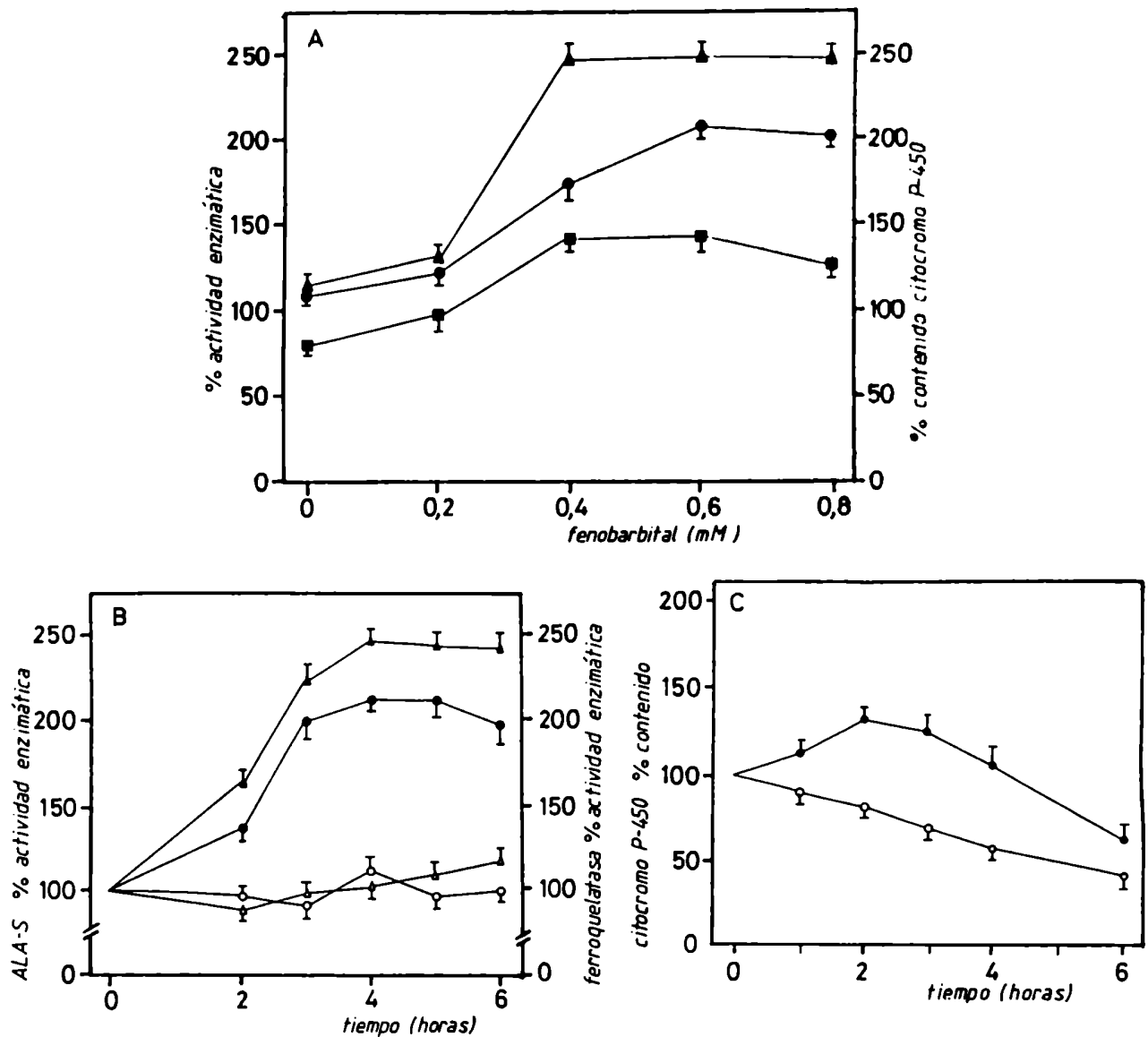


Figura 19: Efecto de fenobarbital sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450

A) Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas con distintas concentraciones de fenobarbital. Fueron determinadas las actividades de ALA-S (●) y ferroquelatasa (▲), luego de 4 horas de incubación, y el contenido de citocromo P-450 (■), luego de 2 horas de incubación. B) Suspensiones de hepatocitos fueron incubados con (símbolos oscuros) y sin (símbolos claros) agregado de fenobarbital 0,6 mM. Las actividades de ALA-S (●○) y ferroquelatasa (▲▲) fueron determinadas a distintos tiempos. C) Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas con (●) y sin (○) agregado de fenobarbital 0,6 mM. El contenido de citocromo P-450 así fue determinado a distintos tiempos. En todos los casos los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 5 experimentos.

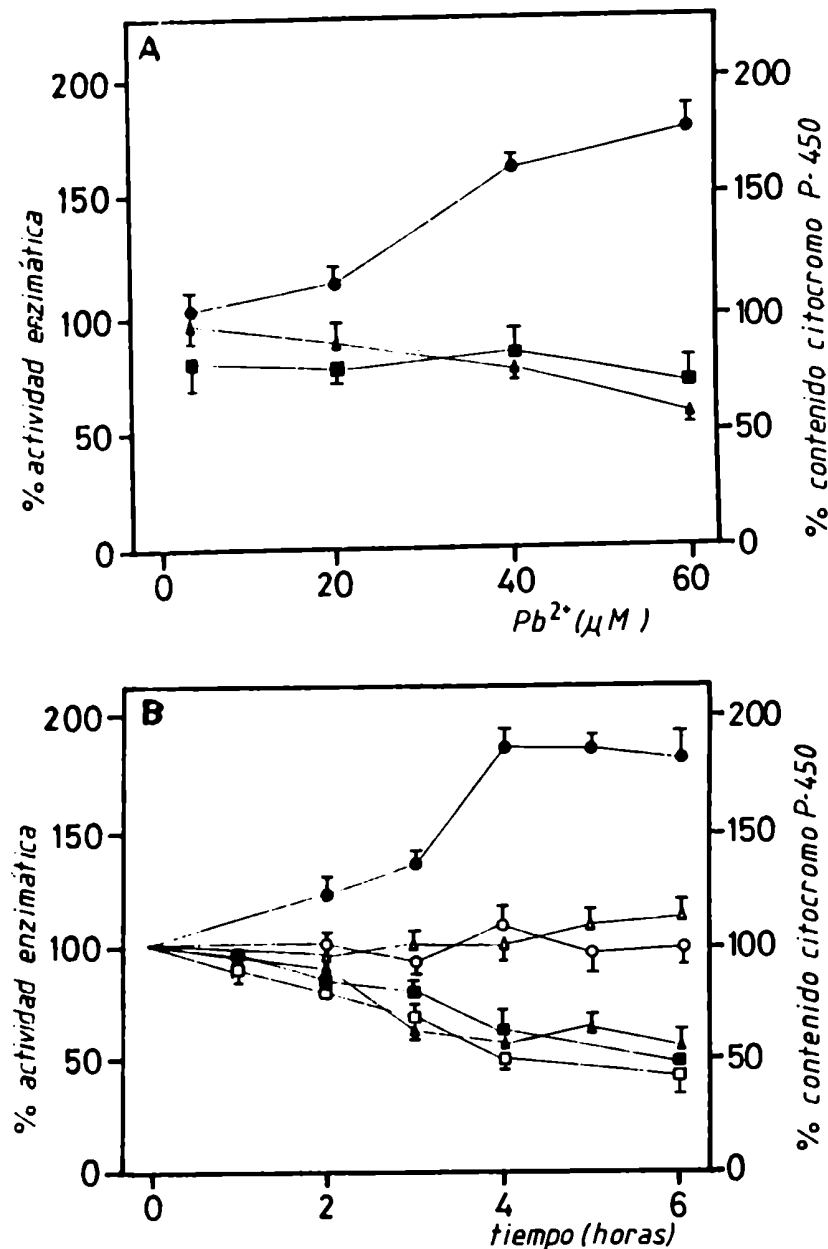


Figura 20: Efecto del plomo sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450

A) Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas con distintas concentraciones de acetato de plomo. Fueron determinadas las actividades de ALA-S (●) y ferroquelatasa (▲), luego de 4 horas de incubación y el contenido de citocromo P-450 (■), luego de 2 horas de incubación. B) Suspensiones de hepatocitos fueron incubados con (símbolos oscuros) y sin (símbolos claros) acetato de plomo 60  $\mu M$ . Las actividades de ALA-S (●○), ferroquelatasa (▲▲) y el contenido de citocromo P-450 (■□) fueron determinados a distintos tiempos. En todos los casos los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.



plateau hasta al menos 6 horas de incubación (figura 20 B). Por el contrario, la actividad de ferroquelatasa, en suspensiones de células conteniendo acetato de plomo 60  $\mu\text{M}$ , disminuyó un 40% después de 3 horas de incubación, manteniéndose luego constante hasta las 6 horas (figura 20 B).

El agregado de acetato de plomo, en concentraciones entre 20 y 60  $\mu\text{M}$ , a suspensiones de hepatocitos de ratas normales, no tuvo efecto sobre el contenido de citocromo P-450 (figura 20 A). Por otra parte, la curva de tiempo obtenida en condiciones basales, no fue modificada por la adición de acetato de plomo(II) 60  $\mu\text{M}$  (figura 20 B).

#### Efecto de la actinomicina D sobre la inducción de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450

En la Tabla XIII se reproducen los resultados obtenidos luego de incubar suspensiones de hepatocitos de rata con los distintos inductores utilizados: AIA, fenobarbital o plomo(II) en presencia y ausencia de actinomicina D. La presencia de este inhibidor de la transcripción en el medio de incubación, en una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , disminuyó drásticamente la inducción de ALA-S y ferroquelatasa por acción ya sea de AIA 1,2  $\text{mM}$  o fenobarbital 0,6  $\text{mM}$ . Del mismo modo, el contenido de citocromo P-450 en presencia de fenobarbital y actinomicina D, se mantuvo en valores cercanos a los de los controles no tratados.

Actinomicina D 1  $\mu\text{M}$  en el medio de incubación también previene la inducción de ALA-S por acetato de plomo 60  $\mu\text{M}$ , tal como se observa en la Tabla XIII.

#### Efecto de cicloheximida sobre la inducción de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450

Como se observa en la Tabla XIII, el agregado de cicloheximida 10  $\mu\text{M}$  junto con AIA 1,2  $\text{mM}$  fue suficiente para prevenir la inducción de ALA-S y ferroquelatasa, dando valores de actividad enzimática, similares a los controles no tratados. La presencia simultánea de cicloheximida 10  $\mu\text{M}$  suprimió totalmente la inducción de ALA-S y citocromo P-450 causada por fenobarbital 0,6  $\text{mM}$ . Sin embargo, si bien fue observada una disminución en la actividad de ferroquelatasa, los valores obtenidos fueron aun superiores a los niveles de los controles no tratados. La acción inductora del acetato de plomo sobre la actividad de ALA-S fue suprimida por acción de cicloheximida 10  $\mu\text{M}$ .

Tabla XIII: Efecto de actinomicina D y cicloheximida sobre las inducciones de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450

Las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450 fueron determinados luego de 5 horas y 2 horas de incubación, respectivamente, de las adiciones mencionadas. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

<u>AGREGADOS</u>	<u>CONC.</u> uM	<u>ALA-S</u> % actividad	<u>FERROQUELATASA</u> % actividad	<u>CITOCROMO P-450</u> % contenido
Control		110 $\pm$ 5	108 $\pm$ 6	75 $\pm$ 3
Actinomicina D	1	86 $\pm$ 6	77 $\pm$ 7	71 $\pm$ 4
Cicloheximida	10	100 $\pm$ 6	97 $\pm$ 6	68 $\pm$ 3
AIA	1200	229 $\pm$ 18	206 $\pm$ 16	
AIA + Actinomicina D	1200 1	139 $\pm$ 11	134 $\pm$ 10	
AIA + Cicloheximida	1200 10	84 $\pm$ 4	103 $\pm$ 6	
Fenobarbital	600	205 $\pm$ 9	223 $\pm$ 12	127 $\pm$ 8
Fenobarbital + Actinomicina D	600 1	128 $\pm$ 8	143 $\pm$ 11	93 $\pm$ 6
Fenobarbital + Cicloheximida	600 10	89 $\pm$ 5	151 $\pm$ 13	84 $\pm$ 3
Ac. de Plomo(II)	60	174 $\pm$ 7		
Ac. de Plomo(II) + Actinomicina D	60 1	114 $\pm$ 5		
Ac. de Plomo(II) + Cicloheximida	60 10	120 $\pm$ 10		

## EFFECTO GLUCOSA SOBRE LAS INDUCCIONES DE ALA-S, FERROQUELATASA Y CITOCROMO P-450

### Efecto de la glucosa

En presencia de glucosa 30 mM, las inducciones de ALA-S y ferroquelatasa mediadas por AIA, fueron parcialmente bloqueadas. Este efecto inhibitorio de la glucosa sobre ambas actividades enzimáticas inducidas fue dependiente del tiempo de incubación (figura 21 A y B). La disminución de ambas actividades fue observada a las 3 horas del agregado simultáneo del inductor y de la glucosa, observándose un descenso de, aproximadamente, un 80% luego de 5 horas de incubación.

En la figura 21 C, puede observarse que el efecto inhibitorio de la glucosa sobre la inducción mediada por AIA fue dependiente de la dosis. Las actividades inducidas de ALA-S y ferroquelatasa disminuyeron alrededor de un 50% con una concentración de glucosa 15 mM.

Las inducciones de ALA-S y ferroquelatasa mediadas por fenobarbital también fueron modificadas por el agregado de glucosa a las suspensiones celulares. En presencia de glucosa 80 mM, se produce una disminución significativa de las actividades de ALA-S y ferroquelatasa inducidas por fenobarbital 0,6 mM, a partir de las 3 y 2 horas, respectivamente (figura 22 A y B). También en este caso, el efecto de la glucosa fue dependiente de la concentración utilizada, obteniéndose el máximo efecto bloqueante de la inducción con 80 mM del hidrato de carbono (figura 22 D).

Por otra parte, el efecto inductor de fenobarbital sobre el contenido de citocromo P-450 no fue modificado por el agregado simultáneo de glucosa, en concentraciones entre 20 y 160 mM, luego de dos horas (figura 22 D), ni por glucosa 80 mM durante 6 horas de incubación (figura 22 C).

Es importante destacar que la presencia de glucosa en las suspensiones de hepatocitos, en cualquiera de las concentraciones utilizadas, sin la adición de AIA o fenobarbital, no modificó los niveles basales de ALA-S y ferroquelatasa ni el contenido de citocromo P-450 (figuras 21 A y B y 22 A, B y C).

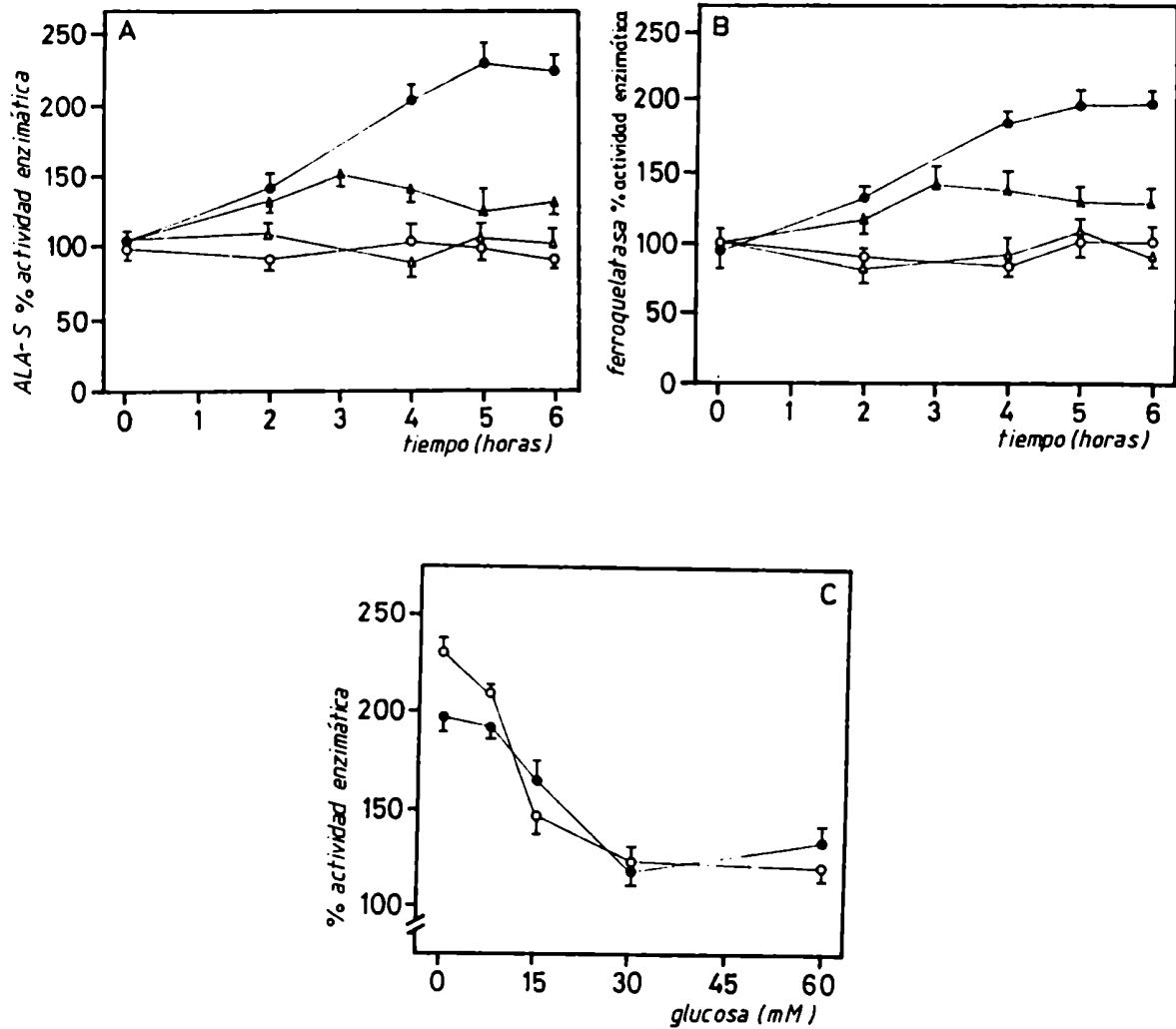


Figura 21: Efecto de la glucosa sobre la inducción mediada por AIA de ALA-S y ferroquelatasa

Suspensiones de hepatocitos fueron incubados con las adiciones indicadas. Las actividades de ALA-S (A) y ferroquelatasa (B) fueron determinadas a distintos tiempos. Las adiciones fueron: ninguna (○); AIA 1,2 mM (●); glucosa 30 mM (Δ); AIA 1,2 mM + glucosa 30 mM (▲). C) Suspensiones de hepatocitos fueron incubados con AIA 1,2 mM y distintas concentraciones de glucosa. Las actividades de ALA-S (○) y ferroquelatasa (●) fueron determinadas luego de 5 horas de incubación. En todos los casos los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

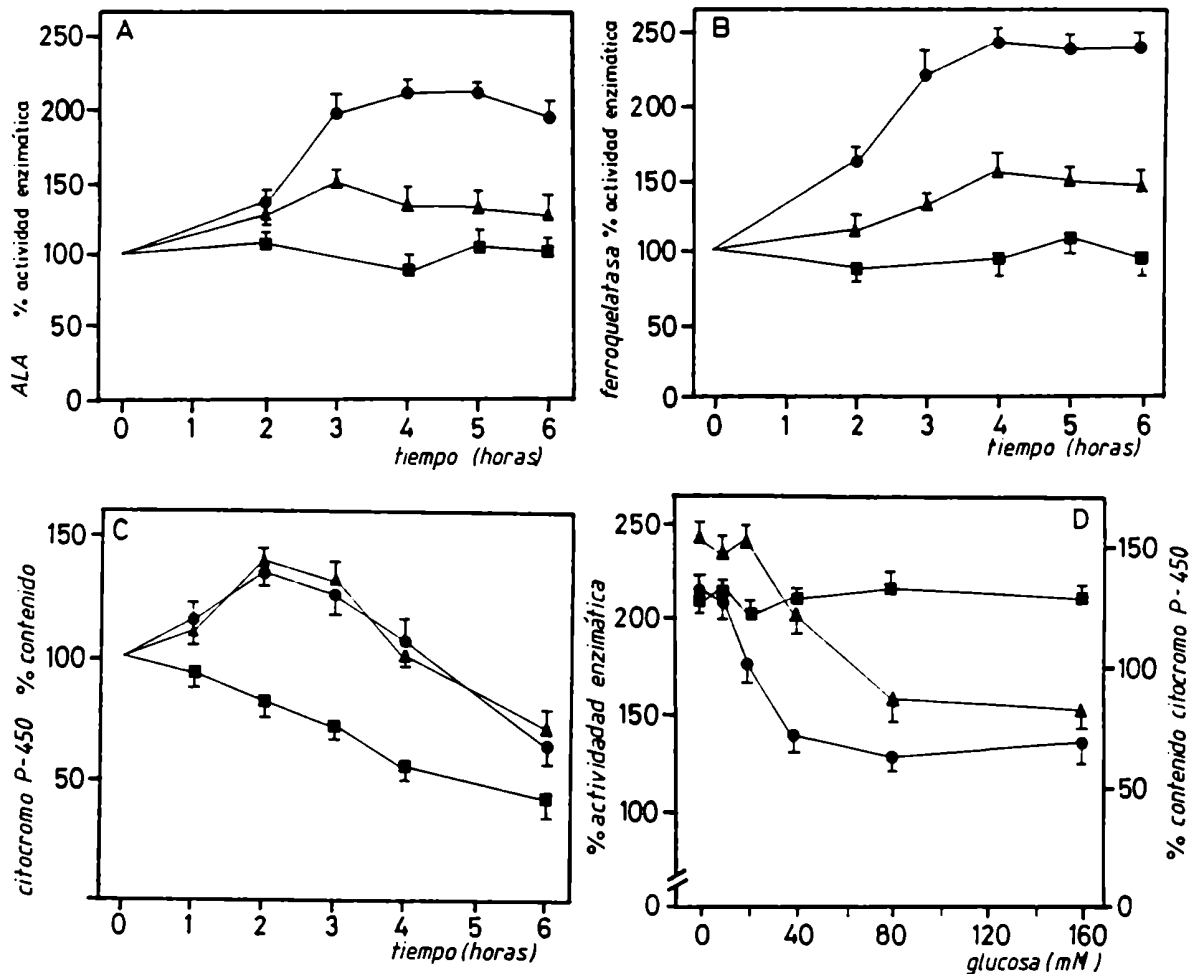


Figura 22: Efecto de la glucosa sobre las inducción mediada por fenobarbital de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450

Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas con las adiciones indicadas. Las actividades de ALA-S (A), ferroquelatasa (B) y el contenido de citocromo P-450 (C) fueron determinados a distintos tiempos. Las adiciones fueron: fenobarbital 0,6 mM (●); glucosa 80 mM (■); fenobarbital 0,6 mM + glucosa 80 mM (▲). D) Suspensiones de hepatocitos fueron incubados con fenobarbital 0,6 mM y distintas concentraciones de glucosa. Las actividades de ALA-S (●) y ferroquelatasa (▲) y el contenido de citocromo P-450 (■) fueron determinados luego de 4 y 2 horas de incubación, respectivamente. En todos los casos los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

Efecto de fructosa, galactosa, manosa, glicerol, piruvato, lactato y 2-deoxiglucosa

Suspensiones de hepatocitos de rata, incubados con AIA 1,2 mM o fenobarbital, fueron tratadas con varios monosacáridos y metabolitos del camino glucolítico.

En la Tabla XIV se observa que las actividades de ALA-S y ferroquelatasa inducidas por AIA fueron disminuidas por la adición simultánea de 2-deoxiglucosa. Este efecto inhibitorio fue dependiente de la dosis, para ambas actividades enzimáticas.

Resultados similares fueron obtenidos con 2-deoxiglucosa en presencia de fenobarbital como inductor. Las actividades de ALA-S y ferroquelatasa fueron 60 y 80% menores, respectivamente, que en ausencia del análogo de la glucosa (Tabla XV).

La fructosa fue el otro compuesto de los ensayados que presentó un efecto similar al de la glucosa. Las actividades de ALA-S y ferroquelatasa, inducidas por AIA (Tabla XIV) o por fenobarbital (Tabla XV), fueron disminuidas por la adición simultánea de la fructosa, aunque este efecto inhibitorio fue menor que el de la glucosa.

La presencia de 2-deoxiglucosa o fructosa en las suspensiones de hepatocitos, en ausencia de inductores, no modificaron los niveles basales de ALA-S o ferroquelatasa.

Galactosa, manosa, glicerol, piruvato y lactato, en las concentraciones utilizadas, no lograron prevenir la inducción de ALA-S y ferroquelatasa, mediadas por AIA o fenobarbital (Tablas XIV y XV).

Por otra parte, el efecto inductor del fenobarbital sobre el contenido de citocromo P-450, no fue modificado por el agregado, junto con el barbitúrico, de fructosa, galactosa, manosa, glicerol, piruvato, lactato o 2-deoxiglucosa, en las concentraciones utilizadas en el experimento.

Tabla XIV: Efecto de varios metabolitos sobre las inducciones mediadas por AIA de ALA-S y ferroquelatasa

Suspensiones de hepatocitos fueron incubados con AIA 1,2 mM y diferentes concentraciones de los compuestos indicados. Las actividades de ALA-S y ferroquelatasa fueron determinadas luego de 5 horas de incubación. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero.

<u>AGREGADOS</u>	<u>CONCENTRACION</u> mM	<u>ALA-S</u> % actividad	<u>FERROQUELATASA</u> % actividad
		210-230	199-203
2-Deoxiglucosa	15	181-195	144-150
	30	170-172	117-128
	60	163-167	112-120
Fructosa	15	212-204	195-200
	30	173-181	180-184
	60	140-152	119-128
Galactosa	15	220-226	189-195
	30	195-199	205-210
	60	201-199	189-202
Manosa	15	225-221	195-190
	30	235-227	207-212
	60	210-220	198-206
Glicerol	15	211-225	182-191
	30	200-200	182-188
	60	210-214	175-180
Piruvato	15	220-237	195-201
	30	210-214	195-206
	60	212-224	185-197
Lactato	15	220-228	200-208
	30	203-209	190-200
	60	210-214	196-200

Tabla XV: Efecto de varios metabolitos sobre la inducción mediada por fenobarbital de ALA-S y ferroquelatasa

Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas con fenobarbital 0,6 mM y diferentes concentraciones de los compuestos indicados. Las actividades de ALA-S y ferroquelatasa fueron determinadas luego de 4 horas de incubación. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero.

<u>AGREGADOS</u>	<u>CONCENTRACION</u> mM	<u>ALA-S</u> % actividad	<u>FERROQUELATASA</u> % actividad
		205-210	223-235
2-Deoxiglucosa	40	165-160	175-195
	80	138-150	150-140
	160	140-150	132-146
Fructosa	40	194-193	224-236
	80	167-143	189-171
	160	165-141	156-157
Galactosa	40	210-212	216-247
	80	207-219	224-212
	160	202-217	209-222
Manosa	40	222-200	217-237
	80	220-220	205-233
	160	196-205	234-207
Glicerol	40	211-201	231-231
	80	202-202	247-216
	160	206-210	221-220
Piruvato	40	214-207	224-230
	80	200-200	220-226
	160	198-209	218-229
Lactato	40	215-206	234-230
	80	211-212	219-241
	160	210-214	215-225



## EFFECTO DEL AMPc SOBRE LAS INDUCCIONES DE ALA-S, FERROQUELATASA Y CITOCROMO P-450

### Efecto del dibutiril AMPc

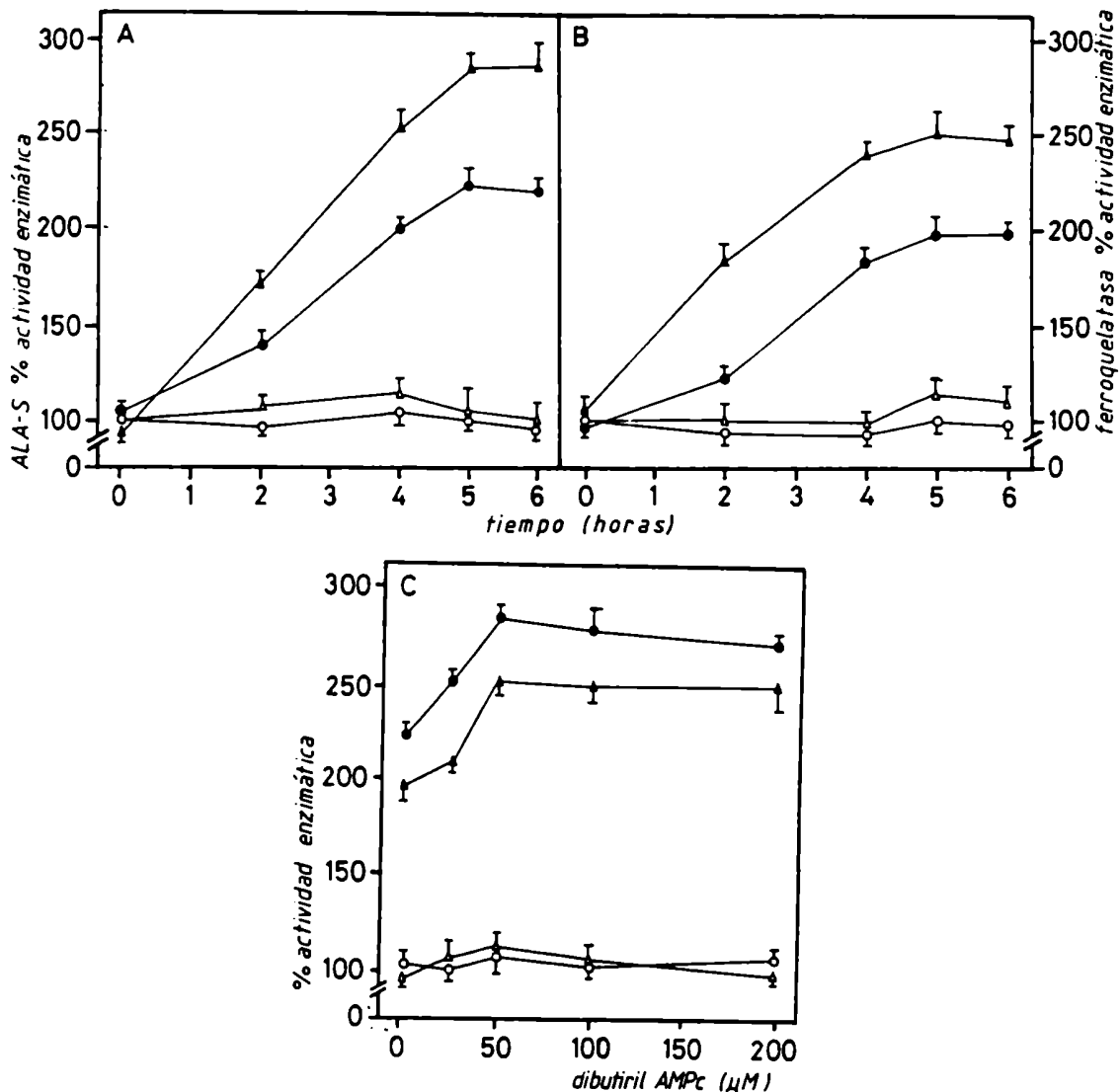
En los siguientes experimentos fue estudiado el efecto de la adición de dibutiril AMPc al medio de suspensión de los hepatocitos sobre las actividades de varias enzimas del camino biosintético del hemo y sobre el contenido de citocromo P-450.

La adición de dibutiril AMPc 50  $\mu$ M al medio de incubación, junto con AIA 1,2 mM, produjo un incremento del efecto inductor de AIA sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa (figura 23 A y B), mientras que el agregado del nucleótido cíclico sólo, en la misma concentración, no modificó los valores basales de ambas actividades enzimáticas. En la curva dosis-respuesta (figura 23 C) puede observarse que, concentraciones entre 50 y 200  $\mu$ M de dibutiril AMPc, potencian significativamente la inducción de ALA-S y ferroquelatasa mediada por AIA, luego de 5 horas de incubación. Ninguna de las concentraciones de dibutiril AMPc utilizadas altera dichas actividades enzimáticas en ausencia del inductor AIA.

Las actividades de succinil CoA sintetasa y de ALA-D no fueron modificadas por la presencia, en la suspensión de hepatocitos, de AIA más dibutiril AMPc o del nucleótido cíclico sólo, bajo las mismas condiciones experimentales usadas para ALA-S y ferroquelatasa.

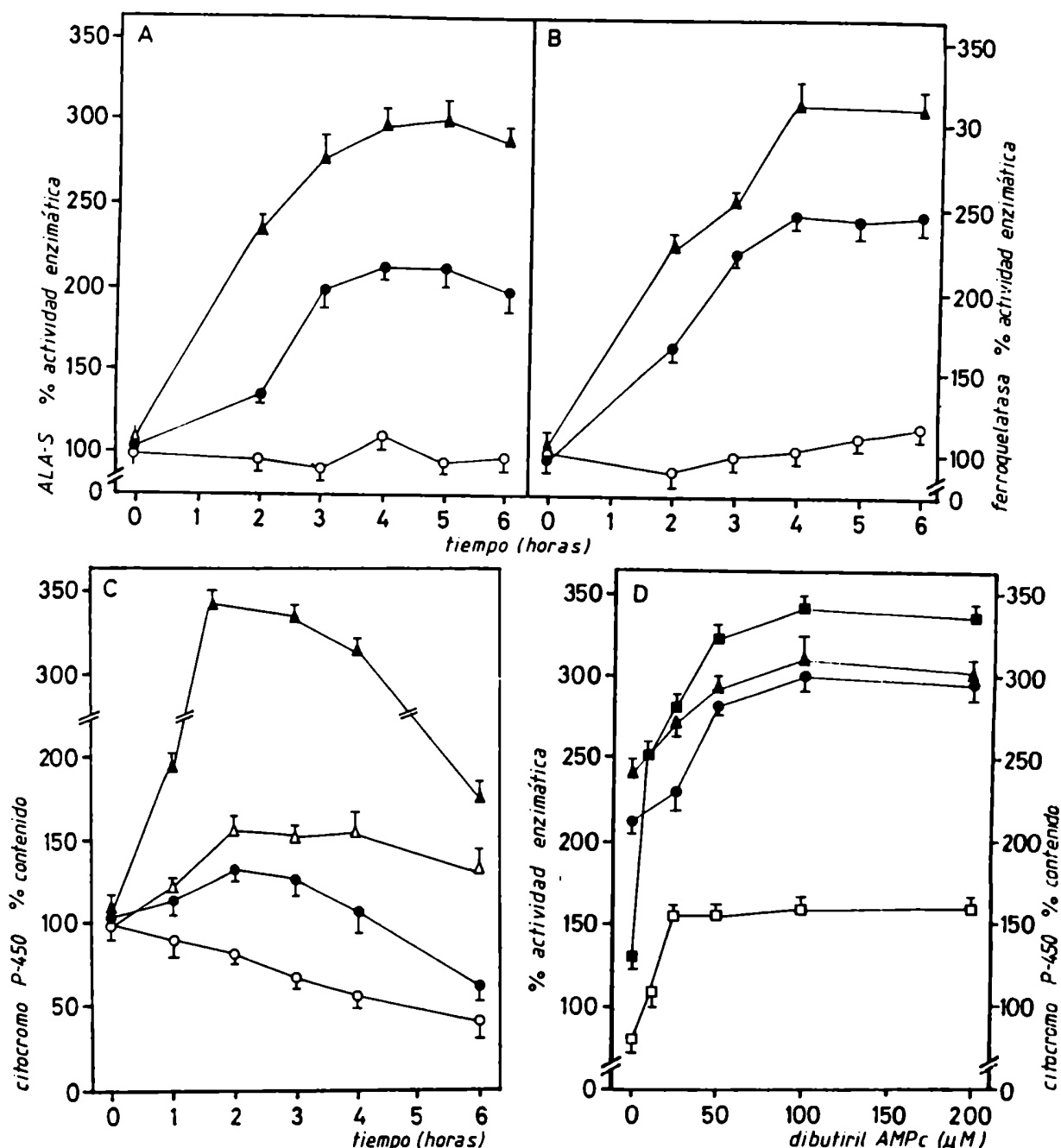
El efecto del dibutiril AMPc fue también determinado en suspensiones de hepatocitos incubados con fenobarbital. Una significativa potenciación de la inducción de ALA-S y ferroquelatasa fue observada luego de la incubación con fenobarbital 0,6 mM más dibutiril AMPc 100  $\mu$ M (figura 24 A y B). Este efecto fue mayor a medida que se aumentó la concentración de dibutiril AMPc (figura 24 D). Por otra parte, las actividades de succinil CoA sintetasa y ALA-D no fueron modificadas por la presencia, en las incubaciones, de fenobarbital más dibutiril AMPc, bajo las mismas condiciones usadas para ALA-S y ferroquelatasa.

El contenido de citocromo P-450 fue ligeramente incrementado cuando los hepatocitos fueron incubados con dibutiril AMPc 100  $\mu$ M. La adición simultánea de dicha concentración de nucleótido y fenobarbital 0,6 mM produjo un efecto sinérgico de potenciación sobre el contenido de citocromo P-450, con un máximo a las 2 horas (figura 24 C). El efecto máximo fue observado con una concentración de dibutiril AMPc 100  $\mu$ M (figura 24 D).



**Figura 23: Efecto del dibutiril AMPc sobre la inducción de ALA-S y ferroquelatasa mediada por AIA**

Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas con las adiciones indicadas. Las actividades de ALA-S (A) y ferroquelatasa (B) fueron determinadas a distintos tiempos. Las adiciones fueron: ninguna (○); AIA 1,2 mM (●); dibutiril AMPc 50 μM (Δ); AIA 1,2 mM + dibutiril AMPc 50 μM (▲). C) Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas con (símbolos oscuros) y sin (símbolos claros) AIA 1,2 mM y con distintas concentraciones de dibutiril AMPc. Las actividades de ALA-S (●○) y ferroquelatasa (▲△) fueron determinadas luego de 5 horas de incubación. En todos los casos los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 5 (A y B) y 4 (C) experimentos.



**Figura 24: Efecto del dibutiril AMPc sobre la inducción de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 mediada por fenobarbital**

Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas con las adiciones indicadas. Las actividades de ALA-S (A) y ferroquelatasa (B) y el contenido de citocromo P-450 (C) fueron determinados a distintos tiempos. Las adiciones fueron: ninguna (○); fenobarbital 0,6 mM (●); dibutiril AMPc 100 uM (▲); fenobarbital 0,6 mM + dibutiril AMPc 100 uM (▲). D) Suspensiones de hepatocitos fueron incubados con (símbolos oscuros) y sin (símbolos claros) fenobarbital 0,6 mM y con distintas concentraciones de dibutiril AMPc. Las actividades de ALA-S (●) y ferroquelatasa (▲) y el contenido de citocromo P-450 (□) fueron determinados luego de 4 y 2 horas de incubación, respectivamente. En todos los casos los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 5 (A, B y C) y 4 (D) experimentos.

### Efecto de actinomicina D y cicloheximida sobre la potenciación causada por el dibutiril AMPc

En la Tabla XVI se observa que la inducción de las actividades inducidas de ALA-S y ferroquelatasa causadas por dibutiril AMPc más AIA o fenobarbital, fueron total o casi totalmente suprimidas por el agregado simultáneo de actinomicina D 1  $\mu\text{M}$  o cicloheximida 10  $\mu\text{M}$ . Del mismo modo, la inducción del contenido de citocromo P-450, mediado por fenobarbital 0,6  $\text{mM}$  más dibutiril AMPc 100  $\mu\text{M}$ , fue reprimido por la adición de actinomicina D o de cicloheximida.

### Especificidad del requerimiento de AMPc

En experimentos anteriores fue demostrado el efecto potenciador del dibutiril AMPc sobre las inducciones de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450. Para comprobar la especificidad del requerimiento de AMPc fueron ensayados diversos compuestos, análogos y derivados del mencionado nucleótido. Dichos compuestos fueron examinados en su capacidad de potenciar la inducción, mediada por fenobarbital 0,6  $\text{mM}$ , de las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450.

Como se observa en la Tabla XVII, solamente los 3 compuestos que contienen AMPc en su estructura fueron capaces de incrementar, significativamente, la inducción de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 producida por fenobarbital. Entre ellos, el análogo metabolizable, 8-bromo-AMPc fue el más efectivo, mientras que el AMPc lo fue en menor grado. Todos los demás compuestos ensayados no fueron efectivos en la estimulación de la inducción por fenobarbital.

### Supresión del efecto glucosa

Los resultados representados en la figura 21 indican que el agregado de glucosa 30  $\text{mM}$  a la suspensión de hepatocitos de ratas normales, impidió la inducción de ALA-S y ferroquelatasa mediada por AIA 1,2  $\text{mM}$ . Así mismo, en la figura 22, se observa que, una concentración de glucosa 80  $\text{mM}$ , tuvo el mismo efecto sobre las actividades de dichas enzimas inducidas por fenobarbital 0,6  $\text{mM}$ . En los presentes experimentos se demuestra que la presencia de dibutiril AMPc 100  $\mu\text{M}$ , junto con glucosa y AIA o fenobarbital, suprime el denominado "efecto glucosa", permitiendo la inducción de las actividades de ambas enzimas, del mismo modo que si la glucosa estuviera ausente.

Tabla XVI: Efecto de actinomicina D y cicloheximida sobre la potenciación por dibutiril AMPc

Las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450 fueron determinados en suspensiones de hepatocitos luego de 5 horas y 2 horas, respectivamente, de las adiciones mencionadas. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

<u>AGREGADOS</u>	<u>CONC.</u> uM	<u>ALA-S</u> % actividad	<u>FERROQUELATASA</u> % actividad	<u>CITOCROMO P-450</u> % contenido
		110 $\pm$ 5	108 $\pm$ 6	75 $\pm$ 3
Actinomicina D	1	86 $\pm$ 6	77 $\pm$ 7	71 $\pm$ 4
Cicloheximida	10	100 $\pm$ 6	97 $\pm$ 6	68 $\pm$ 3
AIA + Dibutiril AMPc	1200 100	285 $\pm$ 13	250 $\pm$ 12	
AIA + Dibutiril AMPc + Actinomicina D	1200 100 1	129 $\pm$ 9	141 $\pm$ 10	
AIA + Dibutiril AMPc + Cicloheximida	1200 100 10	109 $\pm$ 4	117 $\pm$ 5	
Fenobarbital + Dibutiril AMPc	600 100	301 $\pm$ 14	312 $\pm$ 15	330 $\pm$ 10
Fenobarbital + Dibutiril AMPc + Actinomicina D	600 100 1	145 $\pm$ 9	160 $\pm$ 7	109 $\pm$ 6
Fenobarbital + Dibutiril AMPc + Cicloheximida	600 100 10	136 $\pm$ 7	165 $\pm$ 5	120 $\pm$ 5

Tabla XVII: Especificidad del requerimiento de AMPc

Suspensiones de hepatocitos fueron incubados con o sin fenobarbital 0,6 mM y uno de los compuestos indicados. Las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450 fueron determinados luego de 4 horas y 2 horas de las adiciones, respectivamente. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos. FB: Fenobarbital.

<u>AGREGADO</u>	<u>CONC.</u> uM	<u>ALA-S</u>		<u>FERROQUELATASA</u>		<u>CITOCROMO P-450</u>	
		% actividad -FB	% actividad +FB	% actividad -FB	% actividad +FB	% actividad -FB	% actividad +FB
		110 $\pm$ 8	205 $\pm$ 9	108 $\pm$ 4	223 $\pm$ 12	75 $\pm$ 3	127 $\pm$ 8
Dibutiril AMPc	100	104 $\pm$ 6	301 $\pm$ 14	107 $\pm$ 5	312 $\pm$ 15	152 $\pm$ 8	330 $\pm$ 10
AMPc	200	105 $\pm$ 5	249 $\pm$ 12	106 $\pm$ 7	272 $\pm$ 12	138 $\pm$ 7	300 $\pm$ 19
8-bromo AMPc	100	97 $\pm$ 6	368 $\pm$ 17	103 $\pm$ 6	353 $\pm$ 16	153 $\pm$ 4	417 $\pm$ 19
Dibutiril GMPc	200	110 $\pm$ 5	215 $\pm$ 12	111 $\pm$ 8	232 $\pm$ 18	76 $\pm$ 4	124 $\pm$ 8
Dibutiril UMPc	200	108 $\pm$ 7	203 $\pm$ 12	97 $\pm$ 8	208 $\pm$ 14	80 $\pm$ 5	130 $\pm$ 6
AMP	200	110 $\pm$ 10	195 $\pm$ 11	96 $\pm$ 6	220 $\pm$ 15	77 $\pm$ 3	132 $\pm$ 8
GMP	200	115 $\pm$ 5	214 $\pm$ 12	100 $\pm$ 4	215 $\pm$ 16	84 $\pm$ 5	114 $\pm$ 7
UMP	200	101 $\pm$ 4	208 $\pm$ 6	102 $\pm$ 5	224 $\pm$ 13	72 $\pm$ 4	126 $\pm$ 9
Butirato de Na	200	95 $\pm$ 4	222 $\pm$ 12	104 $\pm$ 4	210 $\pm$ 8	75 $\pm$ 4	131 $\pm$ 10

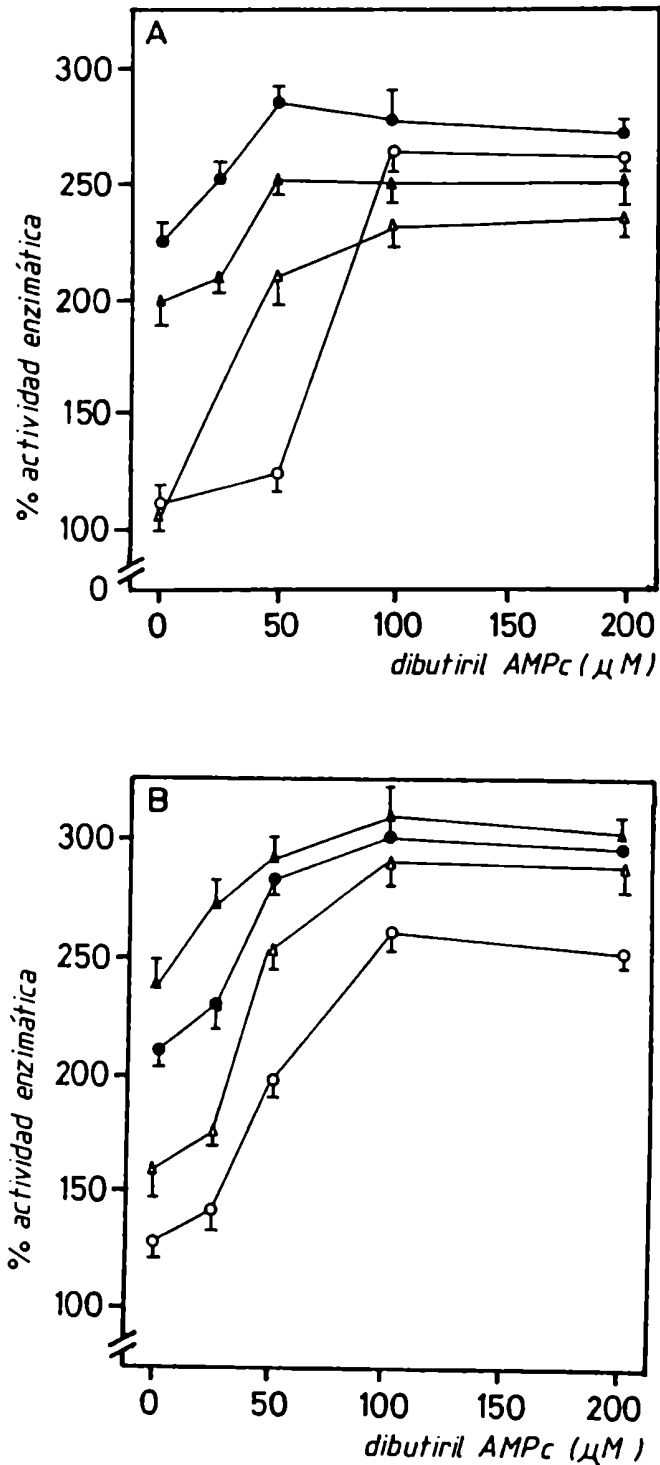


Figura 25: Reversión del efecto glucosa por dibutiril AMPc

Suspensiones de hepatocitos de ratas normales fueron incubadas con las adiciones indicadas y concentraciones crecientes de dibutiril AMPc. Se determinaron las actividades de ALA-S y ferroquelatasa después de 4 horas de incubación. Las adiciones fueron: A) AIA 1,2 mM para ALA-S (●) y ferroquelatasa (▲); AIA 1,2 mM + glucosa 30 mM para ALA-S (○) y ferroquelatasa (△). B) Fenobarbital 0,6 mM para ALA-S (●) y ferroquelatasa (▲); fenobarbital 0,6 mM + glucosa 80 mM para ALA-S (○) y ferroquelatasa (△). Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 5 experimentos.

En la figura 25 A, se observa que el agregado de dibutiril AMPc 50  $\mu\text{M}$  a suspensiones de hepatocitos de ratas normales, conteniendo AIA 1,2  $\text{mM}$ , revirtió la inhibición de la actividad de ferroquelatasa producida por glucosa 30  $\text{mM}$ , llevándola a valores similares a aquellos obtenidos en suspensiones celulares en ausencia de glucosa; dibutiril AMPc 100  $\mu\text{M}$  fue necesario para causar el mismo efecto sobre la actividad de ALA-S.

Por otra parte, en la figura 25 B, se observa que concentraciones crecientes de dibutiril AMPc revirtieron el efecto inhibitorio de glucosa 80  $\text{mM}$  sobre la inducción de ALA-S y ferroquelatasa mediada por fenobarbital 0,6  $\text{mM}$ , dando valores máximos con una concentración de dibutiril AMPc 100  $\mu\text{M}$  y similares a los obtenidos incubando fenobarbital y el nucleótido cíclico exclusivamente.

La supresión del efecto glucosa fue logrado también, reemplazando el dibutiril AMPc por metil isobutil xantina (MIX) o adrenalina. El agregado de una de estas sustancias, a las suspensiones de hepatocitos de ratas normales, junto con glucosa y AIA o fenobarbital, resultó en la inducción de ALA-S y ferroquelatasa, similar en magnitud a la inducción producida en presencia de dibutiril AMPc (Tabla XVIII).

Tabla XVIII: Reversión del efecto glucosa por adrenalina y MIX

Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas con AIA 1,2  $\text{mM}$  o fenobarbital 0,6  $\text{mM}$  y dibutiril AMPc 100  $\mu\text{M}$  y/o glucosa 80  $\mu\text{M}$  y/o adrenalina 20  $\mu\text{M}$  y/o MIX 20  $\mu\text{M}$ . Las actividades de ALA-S y ferroquelatasa fueron determinadas después de 5 horas de incubación. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Cada valor representa el promedio  $\pm$  E.S. de 5 experimentos.

<u>AGREGADOS</u>	<u>ALA-S</u>		<u>FERROQUELATASA</u>	
	% actividad		% actividad	
	AIA	Fenobarbital	AIA	Fenobarbital
-----	229 $\pm$ 18	205 $\pm$ 9	206 $\pm$ 16	223 $\pm$ 12
Dibutiril AMPc	280 $\pm$ 12	301 $\pm$ 14	250 $\pm$ 12	312 $\pm$ 15
Glucosa	122 $\pm$ 11	128 $\pm$ 7	129 $\pm$ 8	160 $\pm$ 16
Dibutiril AMPc + Glucosa	265 $\pm$ 10	263 $\pm$ 13	231 $\pm$ 11	289 $\pm$ 13
Adrenalina + Glucosa	279 $\pm$ 13	278 $\pm$ 15	244 $\pm$ 15	290 $\pm$ 16
MIX + Glucosa	262 $\pm$ 17	270 $\pm$ 14	238 $\pm$ 10	280 $\pm$ 21



DESARROLLO DEL ESTADO DIABETICO EN RATAS Y CONSECUENCIAS SOBRE EL METABOLISMO DEL HEMO EN HEPATOCITOS

Evaluación del desarrollo de la diabetes experimental en los animales

Fueron considerados diabéticos aquellos animales que, luego de 72 horas de la administración de estreptozotocina (STZ), poseyeron niveles de glucosa en suero superiores a 250 mg/dl. Estos animales presentaron, además signos de hiperglicemia, glucosuria, polidipsia, polifagia y un desarrollo corporal reducido. En la Tabla XIX se presentan datos sobre el peso corporal y la concentración de glucosa en suero y en hepatocitos, en distintos intervalos de tiempo luego de la inducción de la diabetes.

Tabla XIX: Peso corporal y concentración de glucosa en suero y en hepatocitos en ratas normales y diabéticas

Los resultados están expresados como promedios  $\pm$  E.S. de 16 animales y preparaciones de hepatocitos diferentes.

<u>DIAS LUEGO DE</u> <u>INYECCION STZ</u>	<u>PESO CORPORAL</u> (g)		<u>GLUCOSA SUERO</u> (mg/dl)		<u>GLUCOSA HEPATOCITOS</u> (mg/10 <sup>6</sup> hepatocitos)	
	<u>No Inyec.</u>	<u>Inyec.</u>	<u>No Inyec.</u>	<u>Inyec.</u>	<u>No Inyec.</u>	<u>Inyec.</u>
5	218 $\pm$ 8	199 $\pm$ 10	128 $\pm$ 8	378 $\pm$ 20	0,23 $\pm$ 0,03	0,75 $\pm$ 0,08
15	230 $\pm$ 7	181 $\pm$ 9	123 $\pm$ 4	405 $\pm$ 17	0,26 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,03
30	252 $\pm$ 12	176 $\pm$ 6	132 $\pm$ 11	454 $\pm$ 21	0,29 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,06

El peso corporal de las ratas luego de 5 y 15 días de inducida la diabetes presentó un descenso del 9 y del 21%, respectivamente, con respecto a los correspondientes animales controles. A los 30 días de la inducción, este descenso fue aun mayor y cercano al 30%. Las concentraciones de glucosa, en suero y en hepatocitos, se mostraron considerablemente aumentadas con respecto a los valores controles en todo momento luego de la inducción de la diabetes. El contenido de proteínas de los hepatocitos no fue modificado luego de 15 días de la administración de STZ, siendo de 1,56  $\pm$  0,21 para los hepatocitos de ratas normales y de 1,69  $\pm$  0,17 para aquellos provenientes de ratas diabéticas expresados como mg de proteínas en 10<sup>6</sup> hepatocitos

(promedio  $\pm$  E.S. de 12 preparaciones diferentes).

La viabilidad de las suspensiones de hepatocitos provenientes de ratas diabéticas, evaluada como el porcentaje de células que excluyen el azul tripan, fue similar al de las preparaciones provenientes de ratas normales. Del mismo modo, el decaimiento de la viabilidad con el tiempo de incubación se mantuvo en valores semejantes a los de los controles normales.

La mortalidad de los animales inyectados con el agente diabetogénico fue casi nula a los 5 días, del 12% a los 15 días y cercano al 20% a los 30 días de su administración.

Actividades de ALA-S y ferroquelatasa y contenidos de citocromo P-450 y AMPc en hepatocitos de ratas normales y diabéticas

Los efectos del estado diabético causado por la administración de STZ, sobre enzimas involucradas en la biosíntesis del hemo fueron estudiadas en hepatocitos de rata. Luego de 15 días de la administración de STZ, las actividades basales de ALA-S y ferroquelatasa presentaron valores similares a aquellos provenientes de ratas normales (Tabla XX).

Por otra parte, fueron observadas variaciones en el contenido de citocromo P-450. El nivel de esta hemoproteína, en los hepatocitos de ratas diabéticas, fue 32% más alto que en los hepatocitos provenientes de ratas normales (Tabla XX). En la misma Tabla XX, puede observarse que el contenido de AMPc fue incrementado cuatro veces en aquellos hepatocitos preparados a partir de animales tratados con STZ.

Tabla XX: Actividad de ALA-S y ferroquelatasa y contenidos de citocromo P-450 en hepatocitos de ratas normales y diabéticas

Las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y los contenidos de citocromo P450 y AMPc fueron determinados a tiempo cero de incubación. Los resultados están expresados como promedios  $\pm$  E.S. de 6 preparaciones diferentes.

	<u>HEPATOCITOS RATAS</u> <u>NORMALES</u>	<u>HEPATOCITOS RATAS</u> <u>DIABETICAS</u>
ALA-S (Unidades/mg proteína)	0,54 $\pm$ 0,06	0,63 $\pm$ 0,03
Ferroquelatasa (Unidades/mg proteína)	1,44 $\pm$ 0,11	1,49 $\pm$ 0,08
Citocromo P-450 (nmoles/10 <sup>6</sup> hepat.)	0,25 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,02
AMPc (pmoles/mg proteína)	6,2 $\pm$ 0,5	24,1 $\pm$ 1,5

## INDUCCION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO EN HEPATOCITOS DE RATAS DIABETICAS

Una vez desarrollado el estado diabético en los animales de experimentación, se estudió la inducción de enzimas de la biosíntesis del hemo y del contenido de citocromo P-450 en suspensiones de hepatocitos provenientes de dichos animales. También se investigaron las variaciones del contenido de AMPc de los hepatocitos, tanto en ratas normales como diabéticas, y su relación con el desarrollo y grado de inducción del mencionado camino metabólico. Para ello, fue utilizado el fenobarbital como inductor de la biosíntesis del hemo. Se estudió también la acción del dibutiril AMPc sobre la inducción por fenobarbital y el efecto de la glucosa sobre dichas inducciones. Se presentan los resultados obtenidos en hepatocitos de ratas diabéticas y posteriormente se resumen los resultados más importantes comparándolos con los obtenidos en hepatocitos de animales normales.

### Inducción de ALA-S y ferroquelatasa en hepatocitos de ratas diabéticas

En la figura 26 se representan las curvas de tiempo correspondientes a la inducción de las actividades de ALA-S y ferroquelatasa con fenobarbital y con fenobarbital más dibutiril AMPc en hepatocitos de ratas diabéticas.

De la observación de la figura 26 y de su comparación con la figura 24 A y B, surge que las actividades de ALA-S y ferroquelatasa son incrementadas más rápidamente por la adición de fenobarbital en los hepatocitos de ratas diabéticas que en los de ratas normales. También la magnitud de la inducción es superior en aquellos, no observándose efecto potenciador alguno por el agregado de dibutiril AMPc 100  $\mu$ M junto con el fenobarbital. Al igual que en hepatocitos de ratas normales, el agregado de dibutiril AMPc 100  $\mu$ M, sólo, a la suspensión de hepatocitos diabéticos, no tuvo ningún efecto sobre la actividad de ALA-S y ferroquelatasa durante 5 horas de incubación.

### Inducción del contenido de citocromo P-450 en hepatocitos de ratas diabéticas

Ya fue mencionado que el contenido de citocromo P-450 en los hepatocitos provenientes de ratas diabéticas es superior al de los hepatocitos de animales controles (Tabla XX). Las características de su inducción por fenobarbital también presentó características disímiles entre hepatocitos

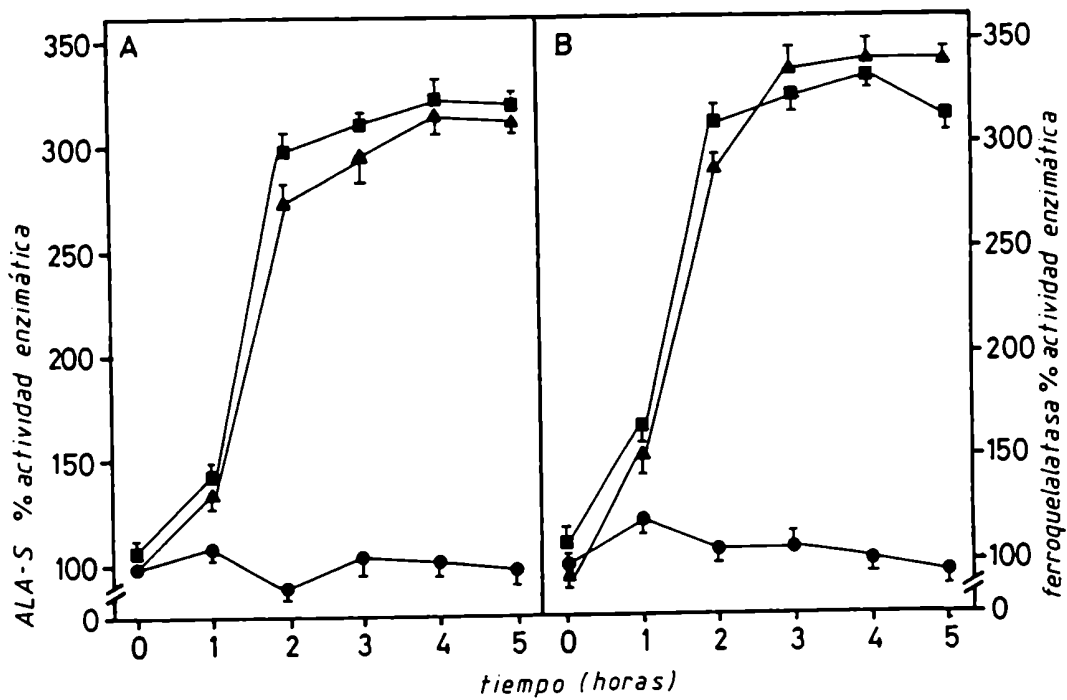


Figura 26: Efecto del fenobarbital y dibutiril AMPc sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa en hepatocitos de ratas diabéticas. Suspensiones de hepatocitos de ratas diabéticas fueron incubadas con las adiciones indicadas. Las actividades de ALA-S (A) y ferroquelatasa (B) fueron determinadas a distintos tiempos. Las adiciones fueron: ninguna (●); fenobarbital 0,6 mM (▲); fenobarbital 0,6 mM + dibutiril AMPc 100 μM (■). Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Cada punto es el promedio  $\pm$  E.S. de 6 experimentos.

normales y diabéticos.

En la figura 27 puede observarse que si bien hay una disminución del contenido de citocromo P-450 en hepatocitos de ratas diabéticas, éste es de sólo un 30% luego de 6 horas de incubación, mientras que la disminución es de un 65% en los hepatocitos de ratas normales (ver figura 24 C). El agregado de fenobarbital a la suspensión de hepatocitos produjo un aumento en el contenido de citocromo P-450 que es máximo a las 2 horas, pero de una magnitud mucho mayor que la observada en hepatocitos de ratas normales (ver figura 24 C).

En la misma figura 27, se observa que el agregado de dibutiril AMPc 100  $\mu$ M junto con el fenobarbital a la suspensión de hepatocitos de animales diabéticos, no causó ningún efecto potenciador sobre el contenido de citocromo P-450 por sobre el ya logrado con el fenobarbital sólo, potenciación que sí es observada en hepatocitos de ratas normales (ver figura 24 C).

#### Efecto de la glucosa sobre la inducción de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 en hepatocitos de ratas diabéticas

Los resultados de los experimentos dirigidos a examinar el efecto de la glucosa sobre la inducción de las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y del contenido de citocromo P-450 mediado por fenobarbital en hepatocitos de ratas diabéticas, se representan en la figura 28.

En esta figura se muestra que, a diferencia de lo observado en hepatocitos de ratas normales (ver figura 22 D), la presencia de glucosa, en concentraciones entre 10 y 160 mM, no modificó la inducción de ALA-S y ferroquelatasa causadas por fenobarbital 0,6 mM o por fenobarbital más dibutiril AMPc 100  $\mu$ M.

En la misma figura 28 se observa que el contenido de citocromo P-450, inducido por fenobarbital o fenobarbital más dibutiril AMPc, tampoco fue alterado por la presencia de glucosa en cualquiera de las concentraciones ensayadas. Este resultado coincide con lo observado en hepatocitos de ratas normales (ver figura 22 D).

Los valores basales de las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y del contenido de citocromo P-450 no son alterados por la presencia de glucosa, sólo, en concentraciones entre 10 y 160 mM en el medio de suspensión de los hepatocitos de ratas diabéticas.

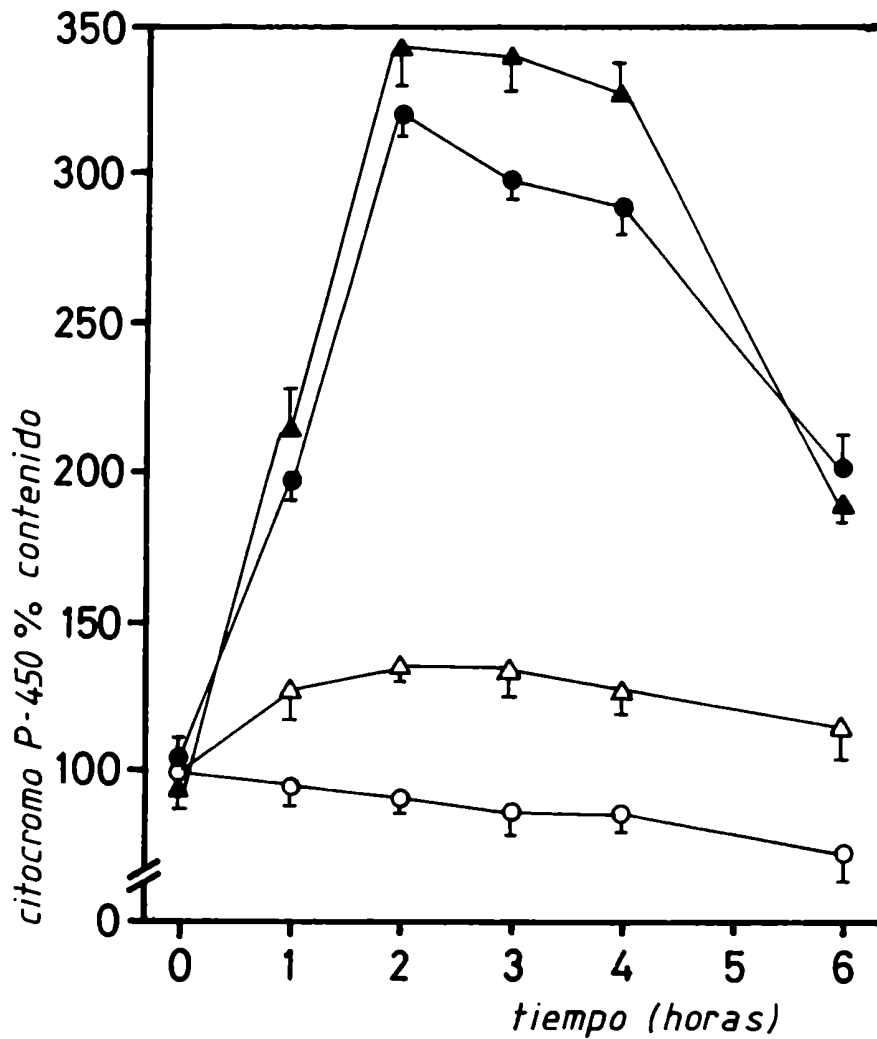


Figura 27: Efecto del fenobarbital y dibutiril AMPc sobre el contenido de citocromo P-450 en hepatocitos de ratas diabéticas

Suspensiones de hepatocitos de ratas diabéticas fueron incubadas con las adiciones indicadas. El contenido de citocromo P-450 fue determinado a distintos tiempos. Las adiciones fueron: ninguna (○); fenobarbital 0,6 mM (●); dibutiril AMPc 100 uM (△); fenobarbital 0,6 mM + dibutiril AMPc 100 uM (▲). Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 5 experimentos.

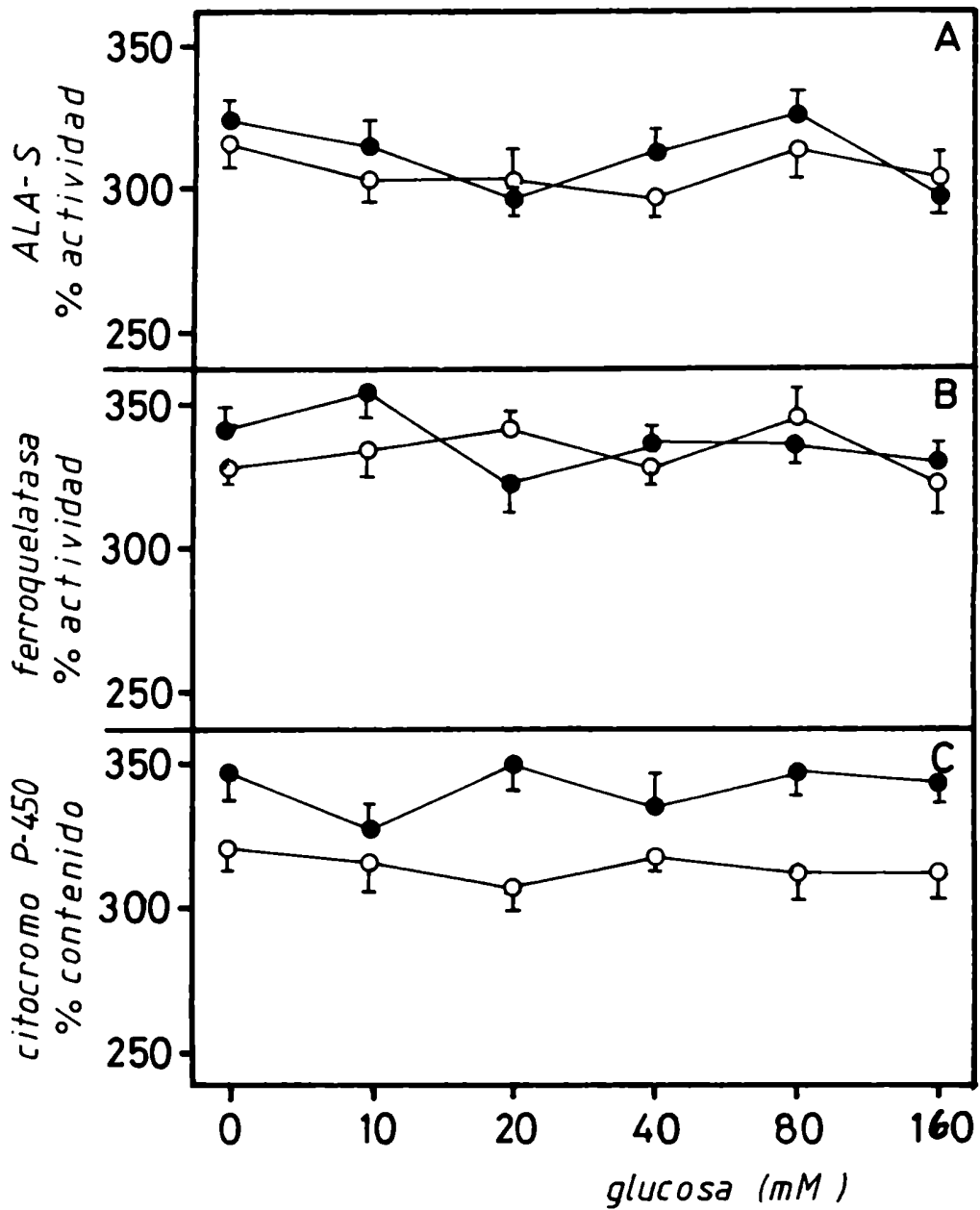


Figura 28: Efecto de la glucosa sobre la inducción de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 en hepatocitos de ratas diabéticas

Suspensiones de hepatocitos de ratas diabéticas fueron incubadas con fenobarbital 0,6 mM (○) o con fenobarbital 0,6 mM + dibutiril AMPc 100 uM (●) y distintas concentraciones de glucosa. Las actividades de ALA-S (A) y ferroquelatasa (B) fueron determinadas a las 4 horas. El contenido de citocromo P-450 (C) fue determinado a las 2 horas. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

ACTIVIDADES DE ALA-S Y FERROQUELATASA Y CONTENIDO DE CITOCROMO P-450. EFECTO DE FENOBARBITAL, GLUCOSA Y DIBUTIRIL AMPc. COMPARACION ENTRE HEPATOCITOS DE RATAS NORMALES Y DIABETICAS

En la figura 29 se comparan los resultados obtenidos en hepatocitos de ratas normales y diabéticas sobre la inducción de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450. Se puede observar, que las inducciones de las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y del contenido de citocromo P-450, mediados por fenobarbital, fueron de mayor magnitud en los hepatocitos de animales diabéticos, alcanzando valores que sólo se lograron, en hepatocitos normales, con el tratamiento conjunto del barbitúrico con dibutiril AMPc. Este nucleótido cíclico, que en hepatocitos normales potencia la acción inductora del fenobarbital sobre ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450, no tuvo ningún efecto en los hepatocitos de ratas diabéticas.

El efecto inhibitorio de la glucosa ejercido sobre las actividades, inducidas por fenobarbital, de ALA-S y ferroquelatasa en hepatocitos normales, no se manifiesta en los diabéticos, manteniéndose invariable la inducción causada por el barbitúrico, aun por el agregado conjunto de dibutiril AMPc. Obviamente, al no haber "efecto glucosa" en los hepatocitos de animales diabéticos, no se encuentra el efecto de reversión del dibutiril AMPc, que sí se manifiesta en los hepatocitos de ratas normales.

EFECTO DE AGENTES MODULADORES DE NIVELES INTRACELULARES DE AMPc EN HEPATOCITOS DE RATAS NORMALES Y DIABETICAS

Para examinar con mayor profundidad el papel del AMPc en la regulación de la biosíntesis del hemo, fueron determinados los efectos causados por la variación de los niveles intracelulares de AMPc, en hepatocitos de ratas normales y diabéticas, sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450.

En todos los casos, los niveles intracelulares de AMPc, modificados por sustancias que aumentan o disminuyen dichos niveles, alcanzan su máximo o mínimo, respectivamente, luego de 1 ó 2 horas de incubación.

Efecto de activadores de adenilato ciclasa

El agregado de adrenalina o forskolina a suspensiones de hepatocitos de ratas normales conteniendo fenobarbital 0,6 mM, produjo un efecto



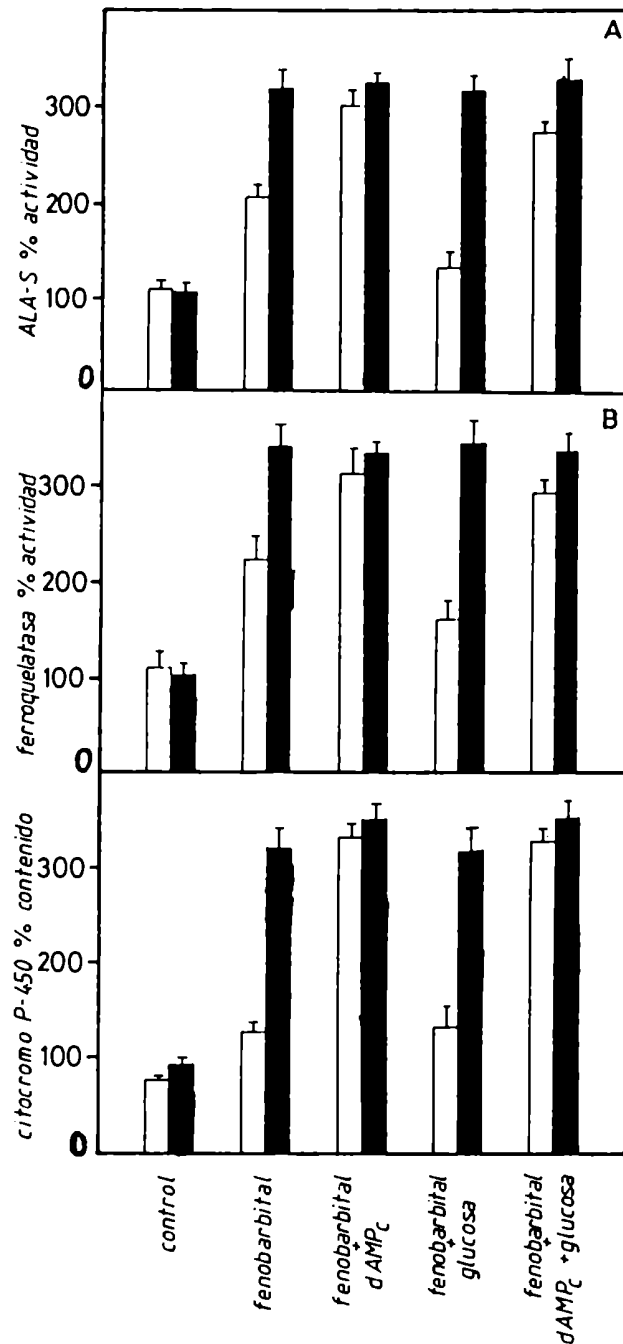


Figura 29: Efecto del fenobarbital, glucosa y dibutiril AMPc sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450 en hepatocitos de ratas normales y diabéticas

Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas con las adiciones indicadas. Las actividades de ALA-S (A) y ferroquelatasa (B) fueron determinadas luego de 4 horas de incubación. El contenido de citocromo P-450 fue determinado luego de 2 horas de incubación. Los resultados están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero. Las barras representan el promedio de 4 experimentos y las líneas verticales el E.S. correspondiente. Hepatocitos de ratas normales (□) y diabéticas (■).

similar al del agregado del dibutiril AMPc, causando la estimulación de las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y del contenido de citocromo P-450 inducidos por fenobarbital (Tabla XXI). Los efectos estimulatorios sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa fueron suprimidos totalmente por la presencia de cicloheximida 10  $\mu$ M, mientras que la inducción sobre el contenido de citocromo P-450 se mantuvo en alrededor de un 20% cuando estaba presente el inhibidor de síntesis proteica.

Por otra parte, el agregado de adrenalina o forskolina, junto con fenobarbital, a suspensiones de hepatocitos de ratas diabéticas, no modificó el nivel de inducción de dichas enzimas y de la hemoproteína, causada por el barbitúrico (Tabla XXI).

La presencia de adrenalina o forskolina en las suspensiones de hepatocitos, sin fenobarbital, no modificaron los niveles basales de las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y del contenido de citocromo P-450.

En la misma Tabla XXI, se observa que el contenido de AMPc, tanto en hepatocitos de ratas normales como de animales diabéticos, fue sustancialmente elevado por el agregado de los activadores de adenilato ciclasa, adrenalina y forskolina.

#### Efecto de inhibidores de fosfodiesterasa

Al igual que en el caso anterior, la adición de MIX o papaverina a suspensiones de hepatocitos de ratas normales, simultáneamente con fenobarbital 0,6 mM, produjo un efecto semejante al del dibutiril AMPc, sobre las inducciones de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 mediadas por el barbitúrico (Tabla XXII). Del mismo modo, las inducciones de ALA-S y ferroquelatasa por fenobarbital y MIX o papaverina, fueron suprimidas totalmente por cicloheximida 10  $\mu$ M, mientras que el contenido de citocromo P-450 disminuyó en un 80% respecto del inducido con fenobarbital y MIX o papaverina.

No hubo cambios en las inducciones de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450, mediadas por fenobarbital, cuando MIX o papaverina fueron agregados a suspensiones de hepatocitos de ratas diabéticas (Tabla XXII).

La presencia de MIX o papaverina en las suspensiones de hepatocitos, sin fenobarbital, no modificaron los niveles basales de las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y del contenido de citocromo P-450.

Se observa que los niveles de AMPc en hepatocitos de ratas normales y diabéticas fueron elevados significativamente por los inhibidores de fosfodiesterasa utilizados (Tabla XXII).

Tabla XXI: Efecto de activadores de adenilato ciclasa

Supensiones de hepatocitos de ratas normales y diabéticas fueron incubados con los agregados indicados. Se determinaron las actividades de ALA-S y ferroquelatasa luego de 4 horas de incubación y los contenidos de citocromo P-450 y AMPc luego de 2 horas de incubación. Los porcentajes se expresan respecto de controles no tratados, a tiempo cero, y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

Fe-Quelatasa: Ferroquelatasa; Cit.P-450: Citocromo P-450; N: Hepatocitos ratas normales; DBT: Hepatocitos ratas diabéticas; FB: Fenobarbital; dibu-AMPc: dibutiril AMPc.

AGREGADOS	CONC. uM	ALA-S		Fe-QUELATASA		CIT.P-450		AMPc	
		% actividad N	% actividad DBT	% actividad N	% actividad DBT	% contenido N	% contenido DBT	pmoles/mg prot N	pmoles/mg prot DBT
	---	110 $\pm$ 5	103 $\pm$ 8	108 $\pm$ 6	101 $\pm$ 7	75 $\pm$ 3	94 $\pm$ 5	6,2	24,1
FB	600	205 $\pm$ 9	315 $\pm$ 17	223 $\pm$ 12	340 $\pm$ 21	127 $\pm$ 8	320 $\pm$ 24	9,2	43,7
FB + dibutAMPc	600 100	301 $\pm$ 14	325 $\pm$ 18	312 $\pm$ 15	335 $\pm$ 19	330 $\pm$ 10	350 $\pm$ 25		
Adrenalina	20	106 $\pm$ 6	98 $\pm$ 4	102 $\pm$ 7	101 $\pm$ 6	163 $\pm$ 5	175 $\pm$ 9	33,6	51,9
FB + Adrenalina	600 20	313 $\pm$ 20	320 $\pm$ 17	305 $\pm$ 14	330 $\pm$ 21	355 $\pm$ 18	350 $\pm$ 19	38,2	37,9
Forskolina	10	124 $\pm$ 10	107 $\pm$ 9	97 $\pm$ 6	109 $\pm$ 7	172 $\pm$ 5	170 $\pm$ 6	37,0	53,0
FB + Forskolina	600 10	308 $\pm$ 19	311 $\pm$ 18	324 $\pm$ 16	318 $\pm$ 19	337 $\pm$ 15	348 $\pm$ 23	34,0	55,0

Tabla XXII: Efecto de inhibidores de fosfodiesterasa

Suspensiones de hepatocitos de ratas normales y diabéticas fueron incubados con los agregados indicados. Se determinaron las actividades de ALA-S y ferroquelatasa luego de 4 horas de incubación y los contenidos de citocromo P-450 y AMPc luego de 2 horas de incubación. Los porcentajes se expresan respecto de controles no tratados a tiempo cero y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

Fe-Quelatasa: Ferroquelatasa; Cit.P-450: Citocromo P-450; N: Hepatocitos ratas normales; DBT: Hepatocitos ratas diabéticas; FB: Fenobarbital; dibutAMPc: dibutiril AMPc.

<u>AGREGADOS</u>	<u>CONC.</u> uM	<u>ALA-S</u>		<u>Fe-QUELATASA</u>		<u>CIT.P-450</u>		<u>AMPc</u>	
		% actividad <u>N</u>	% actividad <u>DBT</u>	% actividad <u>N</u>	% actividad <u>DBT</u>	% contenido <u>N</u>	% contenido <u>DBT</u>	pmoles/mg prot <u>N</u>	pmoles/mg prot <u>DBT</u>
	---	110 $\pm$ 5	103 $\pm$ 8	108 $\pm$ 6	101 $\pm$ 7	75 $\pm$ 3	94 $\pm$ 5	6,2	24,1
FB	600	205 $\pm$ 9	315 $\pm$ 17	223 $\pm$ 12	340 $\pm$ 21	127 $\pm$ 8	320 $\pm$ 24	9,2	43,7
FB + dibutAMPc	600 100	301 $\pm$ 14	325 $\pm$ 18	312 $\pm$ 15	335 $\pm$ 19	330 $\pm$ 10	350 $\pm$ 25		
MIX	20	108 $\pm$ 5	111 $\pm$ 7	107 $\pm$ 6	98 $\pm$ 6	150 $\pm$ 10	164 $\pm$ 11	17,9	48,8
FB + MIX	600 20	295 $\pm$ 18	319 $\pm$ 20	292 $\pm$ 15	329 $\pm$ 17	300 $\pm$ 15	338 $\pm$ 21	19,4	39,3
Papaverina	15	96 $\pm$ 4	104 $\pm$ 6	106 $\pm$ 6	112 $\pm$ 5	165 $\pm$ 8	168 $\pm$ 11	33,6	50,6
FB + Papaverina	600 15	307 $\pm$ 21	323 $\pm$ 22	341 $\pm$ 25	340 $\pm$ 18	335 $\pm$ 13	346 $\pm$ 22	35,0	53,1

Efecto de un inhibidor de adenilato ciclasa y un activador de fosfodiesterasa

En la Tabla XXIII están expuestos los resultados obtenidos con sustancias que disminuyen los niveles intracelulares de AMPc, ya sea por inhibición de adenilato ciclasa (aloxano) o bien a través de la activación de la fosfodiesterasa (imidazol).

En hepatocitos de ratas normales, se observa que dichas sustancias disminuyeron, significativamente, el grado de inducción de ALA-S y ferroquelatasa y sólo ligeramente el de citocromo P-450, mediado por fenobarbital 0,6 mM, en forma paralela a la disminución producida en los niveles intracelulares de AMPc. En ausencia de fenobarbital, tanto el aloxano como el imidazol o ambos, no modificaron las actividades basales de las enzimas, mientras que, con respecto al citocromo P-450, el descenso de los niveles de AMPc provocó una pérdida acentuada de esta hemoproteína, en presencia o ausencia de fenobarbital.

En experimentos con hepatocitos provenientes de ratas diabéticas, sólo el agregado del aloxano e imidazol simultáneamente con el barbitúrico, causaron una disminución parcial de la inducción de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 (Tabla XXIII). En ausencia de fenobarbital, aloxano e imidazol sólo o agregados simultáneamente, no produjeron modificaciones apreciables en los niveles basales de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 en hepatocitos de animales diabéticos.

EFFECTO DE LA ADENOSINA SOBRE LAS INDUCCIONES DE ALA-S, FERROQUELATASA Y CITOCROMO P-450, MEDIADOS POR FENOBARBITAL Y DIBUTIRIL AMPc, EN HEPATOCITOS DE RATAS NORMALES Y DIABÉTICAS

La adenosina presentó un efecto inhibitorio sobre las inducciones de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 en hepatocitos de ratas normales y diabéticas.

En la Tabla XXIV puede observarse que, si bien la adenosina sola en el medio de incubación no tiene efecto sobre los niveles basales de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450, es capaz, en presencia de fenobarbital o fenobarbital más dibutiril AMPc, de suprimir, en gran parte, el efecto inductor y potenciador de estas sustancias, ya sea en hepatocitos de ratas normales como diabéticas.

Tabla XXIII: Efecto de aloxano e imidazol

Suspensiones de hepatocitos de ratas normales y diabéticas fueron incubados con los agregados indicados. Se determinaron las actividades de ALA-S y ferroquelatasa luego de 4 horas de incubación y los contenidos de citocromo P-450 y AMPc luego de 2 horas de incubación. Los porcentajes se expresan respecto de controles no tratados a tiempo cero y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

Fe-Quelatasa: Ferroquelatasa; Cit.P-450: Citocromo P-450; N: Hepatocitos ratas normales; DBT: Hepatocitos ratas diabéticas; FB: Fenobarbital.

AGREGADOS	CONC. uM	ALA-S		Fe-QUELATASA		CIT.P-450		AMPc	
		% actividad N	% actividad DBT	% actividad N	% actividad DBT	% contenido N	% contenido DBT	pmoles/mg prot N	pmoles/mg prot DBT
	---	110 $\pm$ 5	103 $\pm$ 8	108 $\pm$ 6	101 $\pm$ 7	75 $\pm$ 3	94 $\pm$ 5	6,2	24,1
FB	600	205 $\pm$ 9	315 $\pm$ 17	223 $\pm$ 12	340 $\pm$ 21	127 $\pm$ 8	320 $\pm$ 24	9,2	43,7
Aloxano	100	113 $\pm$ 4	114 $\pm$ 3	95 $\pm$ 5	110 $\pm$ 6	66 $\pm$ 3	99 $\pm$ 6	3,8	10,4
FB + Aloxano	600 100	146 $\pm$ 7	329 $\pm$ 20	161 $\pm$ 8	322 $\pm$ 21	114 $\pm$ 7	308 $\pm$ 18	3,9	8,7
Imidazol	100	108 $\pm$ 8	95 $\pm$ 5	99 $\pm$ 6	98 $\pm$ 6	70 $\pm$ 5	101 $\pm$ 6	3,1	7,9
FB + Imidazol	600 100	132 $\pm$ 8	331 $\pm$ 19	142 $\pm$ 9	337 $\pm$ 22	112 $\pm$ 6	313 $\pm$ 20	3,3	8,4
Aloxano + Imidazol	100 100	88 $\pm$ 4	85 $\pm$ 6	98 $\pm$ 9	90 $\pm$ 7	65 $\pm$ 4	84 $\pm$ 6	2,8	5,0
FB + Aloxano Imidazol	600 100 100	112 $\pm$ 7	244 $\pm$ 18	115 $\pm$ 13	317 $\pm$ 20	108 $\pm$ 5	213 $\pm$ 13	2,9	5,1

Tabla XXIV: Efecto de la adenosina sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450 en hepatocitos de ratas normales y diabéticas

Suspensiones de hepatocitos fueron incubadas con las adiciones indicadas. Se determinaron las actividades de ALA-S y ferroquelatasa, después de 4 horas y el contenido de citocromo P-450, después de 2 horas de incubación. Los resultados están expresados en porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero y representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos. N: Hepatocitos de ratas normales; DBT: Hepatocitos de ratas diabéticas.

<u>AGREGADOS</u>	<u>CONC.</u> uM	<u>ALA-S</u> % actividad		<u>FERROQUELATASA</u> % actividad		<u>CITOCROMO P-450</u> % contenido	
		<u>N</u>	<u>DBT</u>	<u>N</u>	<u>DBT</u>	<u>N</u>	<u>DBT</u>
		110 $\pm$ 5	103 $\pm$ 8	108 $\pm$ 6	101 $\pm$ 7	75 $\pm$ 3	94 $\pm$ 5
Fenobarbital	600	205 $\pm$ 9	315 $\pm$ 17	223 $\pm$ 12	340 $\pm$ 21	127 $\pm$ 8	320 $\pm$ 24
Adenosina	500	87 $\pm$ 7	119 $\pm$ 10	93 $\pm$ 6	91 $\pm$ 5	69 $\pm$ 4	85 $\pm$ 4
Fenobarbital + Adenosina	600 500	137 $\pm$ 10	156 $\pm$ 12	114 $\pm$ 9	162 $\pm$ 13	95 $\pm$ 6	197 $\pm$ 9
Fenobarbital + Dibutiril AMPc	600 100	301 $\pm$ 14	325 $\pm$ 18	312 $\pm$ 15	335 $\pm$ 19	330 $\pm$ 10	350 $\pm$ 25
Fenobarbital + Adenosina + Dibutiril AMPc	600 500 100	150 $\pm$ 11	161 $\pm$ 10	148 $\pm$ 7	169 $\pm$ 14	110 $\pm$ 7	210 $\pm$ 18

### CONTENIDO DE AMPc EN HEPATOCITOS DE RATAS NORMALES Y DIABETICAS. EFECIO DE FENOBARBITAL Y GLUCOSA

En la figura 30 se exponen los resultados de los experimentos tendientes a examinar la influencia del fenobarbital y de la glucosa sobre el contenido de AMPc en los hepatocitos normales y diabéticos.

La presencia de fenobarbital 0,6 mM en el medio de incubación causó un incremento del contenido de AMPc, superior al 50%, en hepatocitos de ratas normales, obteniéndose un máximo entre las 2 y 3 horas de incubación (figura 30 A). En experimentos anteriores fue demostrado que el contenido de AMPc en los hepatocitos de ratas diabéticas, es 4 veces más alto que en los de ratas normales (Tabla XX). La adición de fenobarbital 0,6 mM incrementó el contenido del nucleótido cíclico, en hepatocitos de ratas diabéticas, a valores cercanos al doble de los controles no tratados, luego de 3 horas de incubación, para luego ir descendiendo hasta niveles similares a los controles a las 5 horas (figura 30 B).

La adición simultánea de glucosa 80 mM y fenobarbital 0,6 mM suprimió totalmente el ascenso en el contenido de AMPc, en hepatocitos de ratas normales, manteniéndolo en niveles semejantes a los de los controles no tratados (figura 30 A). Por el contrario, en hepatocitos de ratas diabéticas, el incremento del contenido de AMPc, mediado por fenobarbital, fue disminuido sólo un 35% cuando dichos hepatocitos fueron incubados con glucosa 80 mM junto con el barbitúrico (figura 30 B).

### INCORPORACION DE LEUCINA-[H<sup>3</sup>] EN LAS PROTEINAS DE HEPATOCITOS DE RATAS NORMALES Y DIABETICAS

En la siguiente serie de experimentos fueron estudiados los efectos del fenobarbital, dibutiril AMPc, glucosa y el de las sustancias que varían los niveles endógenos de AMPc, sobre la síntesis de proteínas en hepatocitos de ratas normales y diabéticas. La biosíntesis de proteínas fue determinada como la incorporación del aminoácido [4-5 H<sup>3</sup>]-leucina en las proteínas totales de los hepatocitos en incubaciones hasta 5 horas.

En la Tabla XXV se observa que ninguna de las sustancias consideradas modificó la incorporación de la leucina-[H<sup>3</sup>] en las proteínas de los hepatocitos ya sea que provinieran estos de ratas normales como diabéticas.



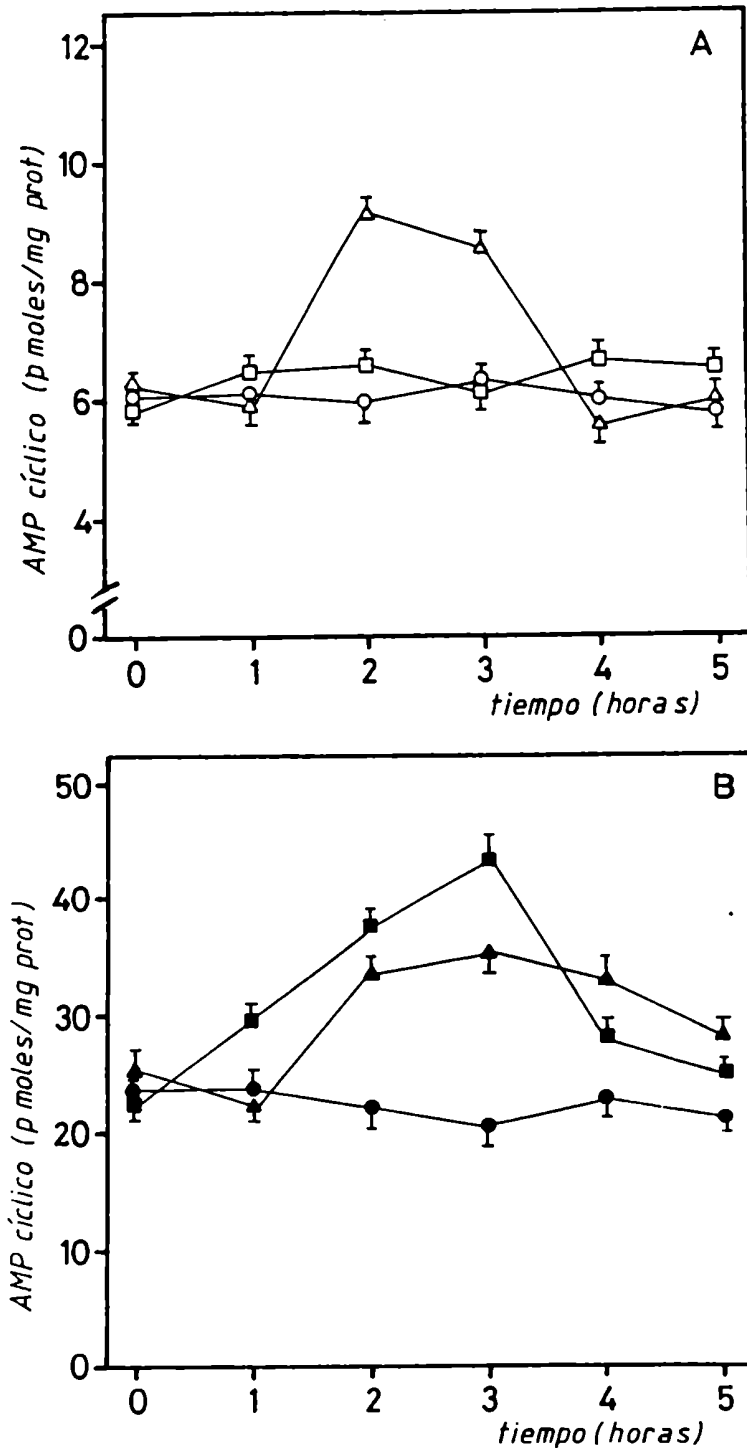


Figura 30: Contenido de AMPc en hepatocitos de ratas normales y diabéticas. Suspensiones de hepatocitos de ratas normales (A) y diabéticas (B) fueron incubadas con las adiciones indicadas. El contenido de AMPc fue determinado a distintos tiempos. Las adiciones fueron: ninguna (○●); fenobarbital 0,6 mM (△■); fenobarbital 0,6 mM + glucosa 80 mM (□▲). Cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

Tabla XXV: Incorporación de [H<sup>3</sup>]-leucina en proteínas de hepatocitos de ratas normales y diabéticas

Suspensiones de hepatocitos de ratas normales (N) y diabéticas (DBT) fueron incubados con los agregados indicados y 10 uCi de [4,5-H<sup>3</sup>]-leucina. A los tiempos indicados, se determinó la radioactividad incorporada a las proteínas en alícuotas de 1 ml de suspensión de hepatocitos, según se indica en Materiales y métodos. Los resultados se expresan como pmoles de leucina tritiada incorporada/10<sup>6</sup> hepatocitos y representan el promedio de 3 experimentos.

AGREGADOS	CONC. uM	TIEMPO DE INCUBACION (HORAS)					
			1	2	3	4	5
		N	4,49	9,54	12,58	16,97	20,86
		<u>DBT</u>	4,15	10,34	12,01	16,55	20,00
Fenobarbital	600	N	4,79	10,10	13,70	17,34	22,14
		<u>DBT</u>	4,28	10,15	13,14	17,15	21,55
Dibutiril AMPc	100	N	4,14	9,60	14,00	18,05	20,18
		<u>DBT</u>	5,08	10,74	13,80	17,85	20,75
Fenobarbital + Dibutiril AMPc	600 100	N	4,16	11,31	13,40	17,15	20,43
		<u>DBT</u>	4,93	11,18	13,45	16,90	20,84
Glucosa 80 mM		N	4,54	9,38	12,95	16,74	20,57
		<u>DBT</u>	4,38	10,40	12,50	17,10	20,45
Fenobarbital + Glucosa 80 mM	600	N	3,97	9,90	12,90	16,95	20,80
		<u>DBT</u>	4,71	9,15	14,00	17,80	21,44
Adrenalina	20	N	4,43	10,04	12,73	18,10	21,54
		<u>DBT</u>	4,54	9,35	12,70	16,54	21,92
Fenobarbital + Adrenalina	600 20	N	4,07	10,72	13,40	17,50	20,30
		<u>DBT</u>	4,19	10,19	13,10	17,85	20,95
MIX	20	N	4,09	10,94	13,70	17,53	21,48
		<u>DBT</u>	4,16	10,70	13,00	17,83	21,78
Fenobarbital + MIX	600 20	N	4,20	10,00	13,75	17,14	21,92
		<u>DBT</u>	4,53	9,80	13,80	18,15	22,40
Aloxano + Imidazol	100 100	N	4,93	9,73	12,79	17,20	22,10
		<u>DBT</u>	4,64	9,70	13,40	17,90	22,00
Fenobarbital + Aloxano + Imidazol	600 100 100	N	4,19	11,00	12,96	16,85	21,50
		<u>DBT</u>	4,37	10,59	12,55	17,15	21,95

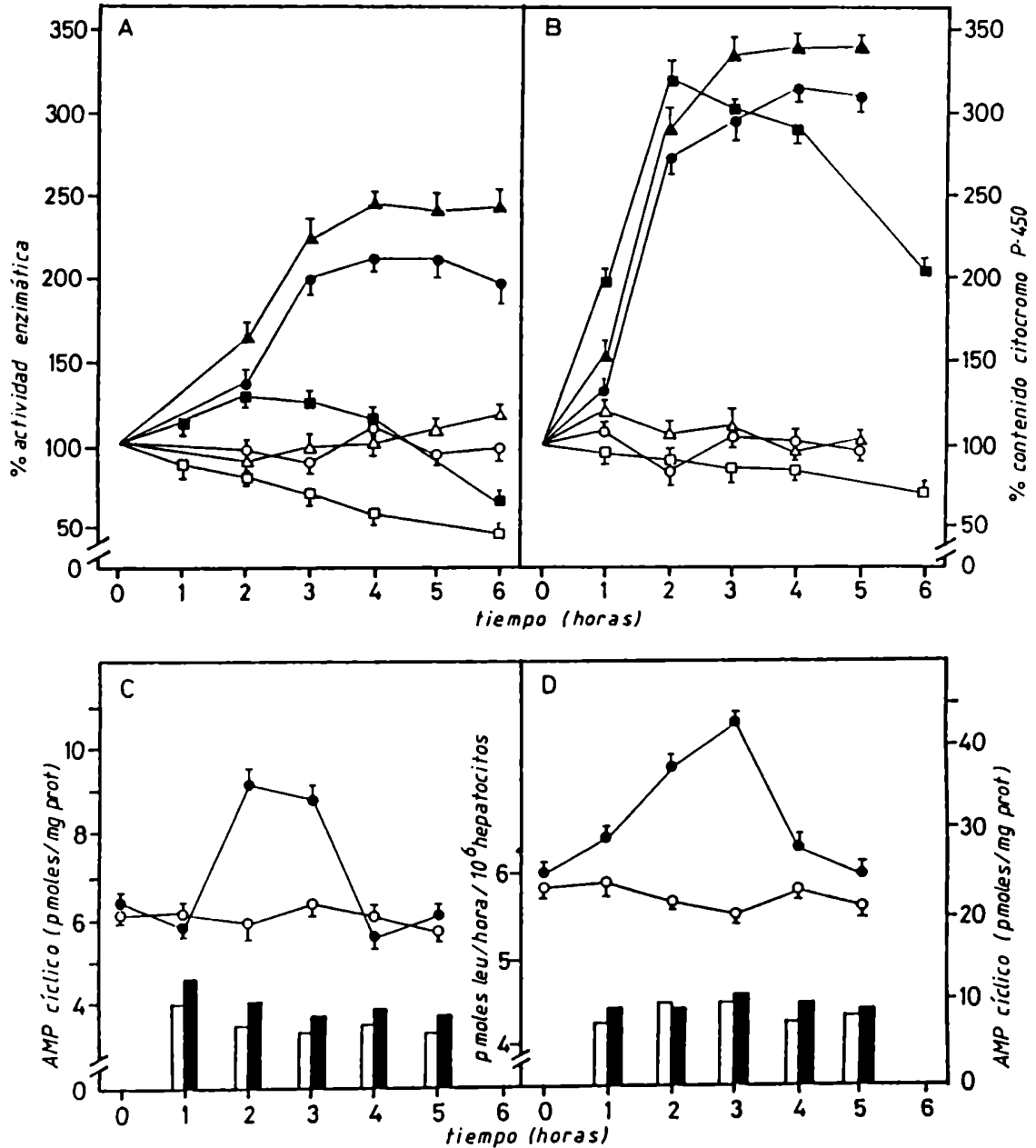
CURVAS DE TIEMPO DE LOS EFECTOS DEL FENOBARBITAL SOBRE LAS ACTIVIDADES DE ALA-S Y FERROQUELATASA, LOS CONTENIDOS DE CITOCROMO P-450 Y AMPc Y LA SIN-  
TESIS DE PROTEINAS EN HEPATOCITOS DE RATAS NORMALES Y DIABETICAS

En la figura 31 se representan, en función del tiempo, los efectos del fenobarbital sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa, los contenidos de citocromo P-450 y AMPc y la incorporación de leucina tritiada a proteínas. Se observa que tanto en hepatocitos de ratas normales como diabéticas, el aumento en el contenido de AMPc y citocromo P-450, precedió siempre a las inducciones en las actividades de ALA-S y ferroquelatasa.

La velocidad de incorporación de leucina tritiada a las proteínas, no fue alterada por el fenobarbital hasta, por lo menos, las 5 h de incubación.

DISTRIBUCION SUBCELULAR DE ALA-S EN HEPATOCITOS DE RATAS NORMALES Y DIABETICAS

El agregado de fenobarbital 0,6 mM a la suspensión de hepatocitos provenientes de ratas normales, produjo un incremento en la actividad específica de ALA-S en el homogenato y en ambas fracciones: mitocondrial y citosólica. Sin embargo, en esta última el incremento fue más elevado (Tabla XXVI A). Cuando las incubaciones fueron realizadas con dibutiril AMPc 100 uM junto con la droga portirínogénica, la actividad de ALA-S fue aumentada a valores aun más elevados en homogenato y fracción mitocondrial con un descenso paralelo de la actividad en la fracción citosólica (Tabla XXVI A). La presencia de glucosa 80 mM en la suspensión de células, junto con fenobarbital, disminuyó la actividad específica de ALA-S a valores similares a los del control, en homogenato y en ambas fracciones subcelulares. La adición, en este caso, de dibutiril AMPc revirtió el efecto inhibitorio de la glucosa, dando valores semejantes a los observados sin la adición del monosacárido (Tabla XXVI A). La presencia de glucosa 80 mM o dibutiril AMPc 100 uM solos en el medio de incubación, no modificaron los niveles basales de actividad específica de ALA-S. Los resultados obtenidos en hepatocitos de ratas diabéticas se resumen en la Tabla XXVI B. La presencia de fenobarbital 0,6 mM produjo un aumento mayor de la actividad de ALA-S que el obtenido en hepatocitos normales, observándose una mayor acumulación en la frac-



**Figura 31: Curva de tiempo de los efectos del fenobarbital**

Suspensiones de hepatocitos de ratas normales (A y C) y diabéticas (B y D) fueron incubadas en presencia (símbolos oscuros) o ausencia (símbolos claros) de fenobarbital 0,6 mM. Las actividades de ALA-S (●○) y ferroquelatasa (▲△) y el contenido de citocromo P-450 (■□) fueron determinados a distintos tiempos (A y B). Los contenidos de AMPcíclico (●○) y la incorporación de leucina- $H^3$  a las proteínas (gráfico de barras) fueron determinadas a distintos tiempos (C y D). Los resultados correspondientes a ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 están expresados como porcentajes respecto de controles no tratados a tiempo cero y cada punto representa el promedio  $\pm$  E.S. de 5 experimentos. Los resultados referidos al contenido de AMPc representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos y los referidos a la incorporación de leucina el promedio de 3 experimentos.

Tabla XXVI: Distribución subcelular de ALA-S en hepatocitos de ratas normales y diabéticas

Suspensiones de hepatocitos de ratas normales (A) y diabéticas (B), fueron incubadas con los agregados mencionados. Luego de 4 horas de incubación fue determinada la actividad de ALA-S en un homogenato de los hepatocitos y en la fracción mitocondrial y citosólica de los mismos, según se indica en Materiales y métodos. Los resultados representan el promedio  $\pm$  E.S. de 4 experimentos.

Tabla XXVI A:

<u>AGREGADOS</u>	<u>CONC.</u> <u><math>\mu</math>M</u>	<u>ALA-S (nmoles</u> <u>HOMOGENAIO</u>	<u>ALA/mg proteína/30 minutos)</u> <u>MITOCONDRIAS</u>	<u>CITOSOL</u>
		0,48 $\pm$ 0,04	0,68 $\pm$ 0,03	0,27 $\pm$ 0,03
Fenobarbital	600	0,96 $\pm$ 0,06	1,36 $\pm$ 0,08	1,54 $\pm$ 0,09
Dibutiril AMPc	100	0,50 $\pm$ 0,04	0,75 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,02
Fenobarbital + Dibutiril AMPc	600 100	1,36 $\pm$ 0,07	2,16 $\pm$ 0,19	0,57 $\pm$ 0,05
Glucosa 80 mM		0,47 $\pm$ 0,05	0,63 $\pm$ 0,03	0,28 $\pm$ 0,02
Fenobarbital + Glucosa 80 mM	600	0,52 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,06	0,33 $\pm$ 0,02
Fenobarbital + Dibutiril AMPc + Glucosa 80 mM	600 100	1,25 $\pm$ 0,25	2,05 $\pm$ 0,09	0,74 $\pm$ 0,03

Tabla XXVI B:

<u>AGREGADOS</u>	<u>CONC.</u> <u><math>\mu</math>M</u>	<u>ALA S (nmoles</u> <u>HOMOGENAIO</u>	<u>ALA/mg proteína/30 minutos)</u> <u>MITOCONDRIAS</u>	<u>CITOSOL</u>
		0,47 $\pm$ 0,04	0,80 $\pm$ 0,08	0,21 $\pm$ 0,02
Fenobarbital	600	1,38 $\pm$ 0,12	2,35 $\pm$ 0,09	0,53 $\pm$ 0,04
Dibutiril AMPc	100	0,51 $\pm$ 0,07	0,83 $\pm$ 0,07	0,22 $\pm$ 0,03
Fenobarbital + Dibutiril AMPc	600 100	1,34 $\pm$ 0,11	2,60 $\pm$ 0,19	0,40 $\pm$ 0,03
Glucosa 80 mM		0,45 $\pm$ 0,05	0,90 $\pm$ 0,08	0,18 $\pm$ 0,02
Fenobarbital + Glucosa 80 mM	600	1,39 $\pm$ 0,11	2,15 $\pm$ 0,15	0,32 $\pm$ 0,04
Fenobarbital + Dibutiril AMPc + Glucosa 80 mM	600 100	1,32 $\pm$ 0,14	2,18 $\pm$ 0,17	0,56 $\pm$ 0,05

ción mitocondrial, contra lo observado en los hepatocitos normales. La adición de glucosa y/o dibutiril AMPc, junto con el fenobarbital, no varió estos resultados.

## DISCUSSION

I - PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE FERRO- Y COBALTOQUELATASA  
DE HIGADO DE CERDO



La ferroquelatasa, la última enzima del camino biosintético del hemo, cataliza la inserción del ión ferroso en protoporfirina IX para formar protohemo. Diversos estudios demostraron que la incorporación de cobalto en porfirinas es enzimática y que estaría catalizada por la cobaltoquelatasa (156, 158, 423). Algunos autores han sugerido la posibilidad que sean dos diferentes enzimas las que catalizan la inserción de estos metales divalentes, aunque otros postularon la existencia de una sola proteína enzimática con afinidad para ambos iones metálicos.

Desde su descubrimiento la ferroquelatasa ha sido estudiada en una gran variedad de organismos y tejidos, y en los últimos años ha sido purificada a homogeneidad (155, 158, 164, 170). Sin embargo, la actividad de cobaltoquelatasa no ha sido aun purificada ni caracterizada.

En este trabajo de tesis, nosotros purificamos las actividades enzimáticas de ferro- y cobaltoquelatasa de hígado de cerdo 465 y 421 veces con un 31 y 28% de rendimiento respectivamente, con el objeto de estudiar sus propiedades y determinar si dos proteínas enzimáticas diferentes están involucradas en la incorporación de los iones hierro(II) y cobalto(II) en mesoporfirina.

La enzima ferroquelatasa es una proteína unida a la membrana interna mitocondrial (168). Debido a esto, el primer paso para la purificación de la ferro- y cobaltoquelatasa, luego de producida la ruptura de las mitocondrias, consistió en encarar la solubilización de la proteína enzimática. Por aplicación de radiación ultrasónica (figura 1) no se produce un aumento significativo de actividad de ferro- y cobaltoquelatasa, si bien luego de 30 seg de su aplicación, se solubilizan más del 90% de las proteínas; tiempos más largos de sonicación causan la disminución de ambas actividades enzimáticas. Esta inactivación puede ser debida a la acción de radicales libres que se forman durante la irradiación ultrasónica en sistemas acuosos, como postularon Swanson y col.(424). Por otra parte, este método de dispersión produce una disociación inespecífica y general de las estructuras lipoproteicas que puede ser causa de inactivación en enzimas estrechamente unidas a lípidos, como sería el caso de la ferroquelatasa.

Dailey (157), solubilizó ferroquelatasa de *Spirillum intersonii*

utilizando agentes caotrópicos. Estos compuestos producen la desestabilización de la membrana debido a que provocan un desordenamiento de las moléculas de agua, debilitando las interacciones hidrofóbicas, y también por disminución de la barrera entrópica para la transferencia de componentes apolares de la membrana a la fase acuosa (425). Sin embargo, nuestros resultados no muestran un aumento significativo en la solubilización de ferro- y cobaltoquelatasa con los agentes caotrópicos utilizados. Estos resultados indicarían que la proteína enzimática se encuentra estrechamente ligada a la fase apolar de la membrana a través de una porción de la cadena polipeptídica que formaría un "dominio" hidrofóbico. Esto es, utilizando la clasificación de Singer y Nicolson (426), la ferro- y cobaltoquelatasa sería una proteína de membrana con características más cercanas a las intrínsecas o integradas que a las periféricas o extrínsecas, ya que éstas son, generalmente, liberadas por bajas concentraciones de moléculas caotrópicas, mientras que aquellas sólo son solubilizadas por acción de detergentes.

En base a esta hipótesis, se utilizaron distintos detergentes para solubilizar la ferro- y cobaltoquelatasa. Uno solo de los ensayados, Tritón X-100 (figura 4), produce un aumento importante de las actividades recuperadas en la fracción soluble. Los otros detergentes utilizados, tanto los no iónicos Tween 20, Lubrol WX y Lubrol PX (figura 3) y el iónico, deoxicolato de sodio (figura 2), son inefectivos o bien provocan una disminución de ambas actividades enzimáticas.

Esta especificidad por un determinado detergente es significativa y adquiere importancia para la caracterización de ferro- y cobaltoquelatasa en sus estados nativos. Un detergente es un compuesto anfifílico con la propiedad de desestabilizar la estructura de las membranas biológicas por solubilización de los lípidos (427). Hay una gran cantidad de detergentes de diferentes estructuras que producen la solubilización diferencial de lipoproteínas. Los factores determinantes de esa solubilidad diferencial son, entre otros, las cargas que posea la molécula de detergente, el largo de la cadena hidrofóbica, la rigidez o flexibilidad de ésta, etc. (428, 429).

Por otra parte, la compleja estructura de la proteína dentro de la membrana, está organizada en una forma opuesta a la de las proteínas solubles: la superficie exterior de la proteína está cubierta con grupos hidrofóbicos mientras que las uniones no covalentes entre porciones diferentes de la cadena polipeptídica involucra principalmente aminoácidos hidrofílicos (430). Tal estructura sólo puede permanecer termodinámicamente estable

mientras el ambiente hidrofóbico sea el correcto, por lo tanto cualquier reactivo usado para desestabilizar la bicapa lipídica y solubilizar la proteína, puede llevar a su desnaturalización.

Es por ello que, el hecho que la ferro- y cobaltoquelatasa hayan sido solubilizadas, sin pérdida de actividad, sólo por uno de los detergentes y con un tratamiento prolongado, es coherente con la hipótesis de que estas actividades enzimáticas se encuentran en una proteína estrechamente ligada a lípidos de membrana y que su actividad depende de la conservación de un entorno hidrofóbico determinado, con una composición lipídica característica.

La mayor parte de los métodos publicados de purificación de ferroquelatasa de hígado de vertebrados, coinciden en la utilización de un detergente específico frente al fracaso de otros (164, 170, 173).

El éxito en la solubilización de ferro- y cobaltoquelatasa, reside en la correcta elección de un detergente que no modifique el entorno lipídico de esta proteína o que, por su estructura, pueda suplir, al menos parcialmente, el núcleo hidrofóbico necesario para el mantenimiento de la actividad enzimática o ambas cosas.

Esta hipótesis estaría abonada por los resultados indicados en las Tablas II y III. Las fracciones solubilizadas con Tritón X-100 2,5% y sometidas a diálisis o ultrafiltración presentan actividades de ferro- y cobaltoquelatasa drásticamente disminuidas. Roodyn (431) ha demostrado que el tratamiento de diálisis debilita las interacciones proteína-lípido y proteína-detergente, produciéndose de este modo la desnaturalización de ciertas proteínas de membranas mitocondriales.

La estabilidad de las fracciones mitocondrial y solubilizada es muy grande aun a 4°C; son estables por varias semanas cuando son guardadas a -20°C sin ningún agregado. Sin embargo la fracción precipitada con sulfato de amonio y, más aún, el eluido de Sephacryl S-300 es mucho menos estable. Luego de 24 horas, la actividad de ferro- y cobaltoquelatasa de la fracción purificada es indetectable. Esto estaría ligado al menor contenido lipídico de estas fracciones con respecto a las primeras y por ende a su progresiva, pero rápida, desnaturalización.

Las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa se recuperan en un solo pico, luego de una corrida por una columna de Sephacryl S-300 (figura

7), que coincide con una proteína de peso molecular 240.000. En una cromatografía similar, pero en Sephadex G-200, se observan varios picos con actividad de ferro- y cobaltoquelatasa en el  $V_0$  y en fracciones correspondientes a pesos moleculares menores. Sin embargo, cuando se realiza la misma corrida agregando al buffer de elución KCl 0,1M, se obtiene sólo el pico correspondiente al  $V_0$  con actividad de ferro- y cobaltoquelatasa (figura 6). Esto se debería a la desaparición de interacciones entre proteínas cargadas y la matriz del gel por aumento de la fuerza iónica.

La pureza de la fracción purificada fue controlada en una electroforesis de gel de poliacrilamida con SDS (figura 8), obteniéndose una banda de peso molecular 40.000 que contiene al menos el 90% de la proteína sembrada. La presencia de una banda menor, que en sucesivas electroforesis correspondió a un peso molecular entre 60.000 y 66.000, no puede explicarse con certeza. Dailey y Fleming (173) postularon que estas trazas de bandas podrían deberse a artificios producidos por columnas utilizadas reiteradamente; sin embargo no puede descartarse la posibilidad de porciones de proteína enzimática, proteolíticamente cortadas, que sólo son separables en condiciones desnaturalizantes como son las empleadas en electroforesis con SDS (158).

La cromatografía en Sephacryl S-300 con el buffer de elución conteniendo Tritón X-100 1% indica que ferro- y cobaltoquelatasa de hígado de cerdo son oligómeros de peso molecular 240.000 y no simples agregados de proteínas, con subunidades de peso molecular 40.000. Nuestros resultados, en este sentido, coinciden con los obtenidos por Taketani y Tokunaga (170) para la ferroquelatasa de hígado de rata.

En la figura 10 se representan las curvas de actividad de ferro- y cobaltoquelatasa en función del tiempo. Cuando la actividad de ferroquelatasa se determina en extractos crudos de mitocondrias en incubaciones bajo atmósfera de nitrógeno y conteniendo glutatión, se obtiene un lag de 15 minutos, más corto que el publicado por Llambías (154), utilizando la misma fuente enzimática, pero en condiciones anaeróbicas y sin agregado de glutatión. Sin embargo, para la formación de cobaltomesoporfirina, se observa un aumento lineal hasta, al menos, 2 horas. Las incubaciones con ferro- y cobaltoquelatasa purificada, bajo atmósfera de nitrógeno, dan incrementos lineales, en la formación de los productos, hasta las 2 horas.

Estos resultados, posiblemente, indican la existencia de una relación directa entre la disponibilidad de hierro reducido y la presencia de agentes reductores, independientemente del tiempo en el que se logre la anaerobiosis (432).

Estas conclusiones parecen avaladas por el hecho de que, en presencia de glutatión, puede detectarse actividad de ferroquelatasa bajo atmósfera de aire, mientras que no se detecta formación de hemo, en aerobiosis, en ausencia de glutatión (154). Koller y col.(432) han informado que, ni el agregado de sustratos oxidables ni la anaerobiosis, tienen efecto sobre la síntesis de cobaltomesoporfirina.

El espectro de absorción UV-visible indica la inexistencia de grupos prostéticos unidos covalentemente a la proteína enzimática purificada (figura 9). Esto es coincidente con los resultados publicados para la ferroquelatasa de diversas fuentes (158, 164, 170, 173).

El pH óptimo es el mismo para las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa (figura 12) y es similar al informado previamente para preparaciones de mitocondrias de hígado de cerdo (433). El hecho observado que, luego de exponer la enzima a los pH indicados y determinar la actividad de ferro- y cobaltoquelatasa, después de reajustar al pH óptimo, no se produzca disminución alguna de actividad, sugiere que las variaciones observadas en la figura 11 se deben a una disminución de la afinidad de la enzima por los sustratos y no por una destrucción irreversible de la enzima. Esto indicaría la presencia de grupos ionizables en el sitio activo de la enzima (434).

La temperatura óptima, para ambas actividades purificadas, es de 42°C (figura 13). Las energías de activación para ferro- y cobaltoquelatasa también son similares y con valores cercanos a los publicados previamente (figura 14)(435, 436). Debido a que la energía de activación es característica de la enzima más que del sustrato, y que una enzima que actúa sobre varios sustratos tendrá la misma energía de activación para todos ellos (434), nuestros resultados sugieren la existencia de una sola proteína enzimática con actividad de ferro- y cobaltoquelatasa.

Los valores de  $K_m$  son similares para hierro(II) y cobalto(II), siendo un poco más bajo para el primero de ellos (Tabla V). Los valores de  $K_m$  para hierro son parecidos a los obtenidos para mitocondrias de hígado de rata (170), cloroplastos de espinaca (161) y *R. spheroides* (158). El valor de  $K_m$  para mesoporfirina es un 50% más alto cuando el cobalto, el sustrato

no fisiológico, es quelado (Tabla V). El valor de  $K_m$  para mesoporfirina con hierro es ligeramente superior al encontrado para ferroquelatasa de otras fuentes (160, 178). Dado que estos investigadores han usado métodos distintos para la determinación de ferroquelatasa, las diferencias en los valores de  $K_m$  podrían ser atribuidas a variaciones de los métodos.

En la Tabla VI se muestran los resultados de los efectos de diferentes cationes divalentes sobre las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa. Todos los cationes estudiados presentan acciones similares sobre ambas actividades enzimáticas. Dos de ellos, plomo y mercurio, causan una fuerte inhibición. Resultados similares fueron encontrados por Hanson y Dailey (164), Taketani y Tokunaga (170) y Dailey (158), estudiando ferroquelatasa de eritrocitos de pollo, de hígado de rata y de la bacteria *R. spheroides*, respectivamente. Debido a que estos iones metálicos tienen la propiedad de unirse fuertemente a grupos SH, la inhibición resultante de su presencia se debería a su habilidad para combinarse con grupos SH libres, necesarios para la actividad enzimática.

El zinc es el otro catión divalente que inhibe fuertemente ambas actividades enzimáticas, sobre todo en la concentración más elevada. Taketani y Tokunaga (155) y Camadro y col. (167) han demostrado que, la ferroquelatasa de hígado bovino y humano, respectivamente, utilizan el zinc(II) como sustrato. Más aun, el  $K_m$  correspondiente sería, en ambos casos, menor que el del hierro.

De los restantes metales ensayados, el  $Mg^{2+}$  no tiene efecto y el  $Cu^{2+}$ , en su concentración más elevada, inhibe un 50% ambas actividades, en coincidencia con lo informado por otros investigadores (164, 170). El efecto inhibitorio del  $Cu(II)$  no está de acuerdo con los resultados publicados por Tephly y col. (330) y Dailey (157) sobre la acción de metales sobre ferroquelatasa de hígado de rata y de la bacteria *S. intersonii*. Estos autores encontraron un efecto activador del  $Cu^{2+}$  50  $\mu M$ , siendo los únicos sistemas biológicos en los cuales se ha detectado.

Sorpresivamente el  $Mn^{2+}$  causa una ligera activación, tanto de ferroquelatasa como de cobaltoquelatasa. Dada la gran dispersión de datos publicados con respecto a la acción del  $Mn(II)$  sobre la ferroquelatasa (158, 164, 170), es difícil la interpretación de nuestros resultados. Sin embargo, hay referencias del efecto activador de este catión sobre otras

enzimas de membrana (437).

En diversos trabajos ha sido sugerido que la ferroquelatasa contiene grupos SH que son esenciales para la actividad de la enzima (155, 158, 180, 181).

Los resultados indicados en la Tabla VII demuestran claramente, que distintas clases de reactivos sulfhidrúlicos disminuyen significativamente las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa. Así es que el ácido p-cloromercuriobenzoato (PCMB) inhibe ambas actividades enzimáticas. Esta inhibición es revertida por la adición de cisteína 1 y 5 mM. Boyer (438) y Riordan y Vallée (439), han demostrado que la inhibición por PCMB es específica para residuos de cisteína y que es rápidamente revertida por el agregado de una sustancia tiólica de bajo peso molecular.

Del mismo modo, la presencia de iodoacetamida 1 mM inhibe, aproximadamente un 70%, las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa. Estos resultados están de acuerdo con lo observado por Taketani y Tokunaga (170) en estudios realizados sobre ferroquelatasa de hígado de rata.

Por otra parte, el sulfito de sodio 1 mM disminuye drásticamente las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa. Este reactivo ha sido indicado como específico para la identificación de residuos cisteína y cistina (440).

Los resultados obtenidos sugieren que los grupos SH desempeñarían un importante papel durante la catálisis de la formación de hemo por la ferroquelatasa.

Dos son los posibles papeles que cumplirían los grupos SH en la actividad de ferroquelatasa y cobaltoquelatasa. Uno de ellos podría ser la unión de la protoporfirina a través de los grupos vinilos, como ha sido sugerido para la protoporfirinógeno oxidasa (144), y el otro sería la unión del ión metálico. La primera posibilidad es la menos probable dado que otras porfirinas, como la mesoporfirina y la deuteroporfirina, han sido utilizadas como sustratos (155, 158), las cuales no contienen grupos vinilos. La segunda posibilidad es más atractiva considerando la gran cantidad de complejos de Fe y S que existe en la naturaleza.

Por otra parte, si alguna de estas posibilidades fuera correcta, sería de esperar que uno o ambos sustratos, protegieran a la enzima de la inhibición causada por un reactivo sulfhidrúlico.

Esta posibilidad fue examinada en los experimentos cuyos resultados se representan en la figura 16. En ella se observa que los iones metálicos hierro(II) y cobalto(II), y no la porfirina, son capaces de proteger la actividad de ferro- y cobaltoquelatasa, respectivamente, de la inactivación por iodoacetamida 1 mM. Si bien la protección causada por los iones metálicos no es absoluta, alcanza valores altamente significativos. Estos resultados coinciden con los observados por Dailey sobre ferroquelatasa de hígado bovino y utilizando N-etilmaleimida como reactivo de grupos SH (181).

Sin embargo, los resultados presentados al respecto, no excluyen la posibilidad de la existencia de un grupo SH, no relacionado directamente con la unión del metal, pero que resulte protegido por un cambio conformacional asociado con la unión del hierro o del cobalto.

Webb (441) ha demostrado que el arsenito de sodio actúa sobre varias proteínas, formando un puente entre ambos grupos SH vecinales. En la Tabla VII se observa que el arsenito de sodio 1 mM fue capaz de inhibir significativamente las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa. Este último resultado es compatible con la sugerencia de que los iones  $Fe^{2+}$  y  $Co^{2+}$  se unirían a la proteína enzimática a través de grupos SH vecinales.

Estos resultados y los obtenidos en la Tabla VIII, que indican que los iones metálicos son efectivos en la protección de la actividad de ferro- y cobaltoquelatasa frente a la inactivación por calor, mientras que la mesoporfirina tiene escaso o nulo efecto protector, conducen a la siguiente conclusión. Los grupos SH serían esenciales para las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa y, el evento inicial de la catálisis sería la unión del ión metálico a la proteína enzimática a través de grupos SH vecinales. Los resultados obtenidos coinciden con lo observado por Dailey y Fleming (173), en ferroquelatasa de hígado bovino.

Se investigó el efecto de los lípidos sobre las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa purificadas. Nuestros resultados, representados en la Tabla IX, indican que los fosfolípidos incrementan significativamente ambas actividades enzimáticas, independientemente de la naturaleza de la porción polar de la molécula. Los fosfolípidos, que desempeñan un papel importante sobre un gran número de enzimas, particularmente en aquellas unidas a membranas mitocondriales, microsomales o lisosomales (442), pueden



actuar de dos maneras: facilitando la unión de los sustratos a la enzima o modificando la estructura proteica y por lo tanto su función.

En el caso de la ferroquelatasa, Yoneyama y col.(443) sugirieron un mecanismo de acción del primer tipo, en el cual los fosfolípidos ácidos con una carga negativa, otorgada por el anión fosfórico, atraen al ión ferroso, siendo éste luego transferido a la región hidrofóbica de los lípidos donde es desolvatado y accesible a la molécula de porfirina, que es poco soluble en condiciones acuosas. Nuestros resultados no concuerdan exactamente con los postulados de estos autores, ya que la fosfatidilcolina, con una fuerte carga positiva de la colina, incrementa ambas actividades enzimáticas del mismo modo que los ácidos fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina (Tabla IX). Sin descartar la hipótesis anterior, nuestros resultados indicarían que la estimulación de ferro- y cobaltoquelatasa por fosfolípidos, sería consecuencia de su habilidad para alterar la estructura de la proteína enzimática y modificar su ámbito en la membrana interna de la mitocondria. En este caso cobraría importancia la composición en ácidos grasos del fosfolípido. En conexión con esto, en la misma Tabla IX se observa que los ácidos grasos aumentan las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa en relación directa con su grado de insaturación y que, el colesterol, anula la activación producida por fosfolípidos y ácidos grasos insaturados. Es sabido que las insaturaciones de las cadenas carbonadas interfieren con las interacciones hidrofóbicas, dando lugar a un núcleo hidrocarbonado más fluido (172). Por otro lado, el colesterol modifica la fluidez de las membranas (444). Los resultados de la Tabla IX sugieren que las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa dependen de una fase hidrofóbica fluida. La fluidez de la fase hidrofóbica podría facilitar la obtención de una conformación de la proteína enzimática más favorable a los sustratos y/o permitir una mayor movilidad de la enzima dentro de la membrana.

Nuestros resultados indicarían que la ferro- y cobaltoquelatasa en su estado nativo, está estrechamente asociada con lípidos, más precisamente, se encontraría como una lipoproteína unida a la membrana mitocondrial. La remoción parcial o total de su contenido lipídico sería una de las principales causas de su inestabilidad durante los diversos procedimientos de aislamiento y purificación.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las actividades de ferro- y cobaltoquelatasa son purificadas en forma paralela. Los gráficos de elución de las columnas de Sephacryl S-300 son muy similares para ambas actividades, además de presentar un comportamiento similar en electroforesis con SDS.

El idéntico pH óptimo y los valores de energía de activación similares también sugieren que una sólo enzima está involucrada en la catálisis. Esta conclusión es confirmada por los efectos similares observados sobre ambas actividades de cationes divalentes, reactivos sulfhidrúlicos, ácidos grasos, fosfolípidos y colesterol.

En vista, entonces, de los resultados presentados, obtenidos con preparaciones purificadas de mitocondrias de hígado de cerdo, sugerimos que una sólo enzima es la responsable de la inserción de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Co}^{2+}$  en mesoporfirina.

II - MECANISMOS DE REGULACION EN LA BIOSINTESIS DEL HEMO  
EN SUSENSIONES DE HEPATOCITOS DE RATA

La utilización de suspensiones de hepatocitos de rata como modelo para el estudio del metabolismo hepático de sustancias endógenas o xenobióticos, ha sido ya ampliamente aceptado debido a las considerables ventajas que presenta frente a los estudios sobre "slices" de hígado o en el hígado perfundido (445, 446). Entre estas ventajas pueden mencionarse: a) no hay ruptura de membranas; b) puede ser aislada una población relativamente homogénea de células; c) el medio de cultivo está directamente en contacto con las células sin una barrera intestinal o vascular; d) pueden ser llevados a cabo una gran cantidad de experimentos simultáneamente (447, 448).

La preservación de las membranas y las estructuras subcelulares y las interrelaciones entre las diferentes organelas, que sustentan una actividad metabólica intacta, combinada con la accesibilidad de las células a los sustratos, y la posibilidad de cambio en las condiciones ambientales, hacen del sistema de suspensiones de hepatocitos aislados, una herramienta fundamental en el estudio de los procesos bioquímicos y fisiológicos en los cuales esté involucrado el hígado, particularmente aquellos concernientes al metabolismo. Por estas razones hemos utilizado este sistema en nuestros estudios sobre la biosíntesis del hemo y su regulación.

Las suspensiones de hepatocitos obtenidas en diferentes preparaciones constituyen poblaciones suficientemente puras de células parenquimales, a juzgar por la observación microscópica, como para descartar contaminaciones importantes con otros tipos de células (no parenquimales, fibroblastos, células de Kupffer, eritrocitos, etc.). Los rendimientos obtenidos varían entre  $15-20 \times 10^6$  células por gramo de hígado y son similares a los publicados por Fry y col. (403) en el método original.

Considerable importancia se otorgó a la medición de distintos parámetros que fueron seleccionados como criterios para determinar la viabilidad de los hepatocitos. Esto fue así, debido a que durante el proceso de aislamiento, las células hepáticas pueden ser dañadas por remoción del  $Ca^{2+}$ , por la acción de enzimas líticas o por ruptura mecánica. En primer término, fue determinado el porcentaje de viabilidad celular, basado en el hecho que las células que conservan intacta su membrana plasmática son capaces de excluir colorantes tales como el azul tripán, mientras que las células dañadas se tiñen, con particular intensidad, en el núcleo (405). Además, la aparición en el medio de incubación de las células, de enzimas so-

lubles tales como la lactato deshidrogenasa (LDH), es también una expresión de daño en las estructuras de la membrana (449, 450). De los datos presentados en la figura 17, surge que el porcentaje de viabilidad de las preparaciones de hepatocitos es del 82%, sólo ligeramente inferior al publicado en el método original. Confirmando estos resultados, en la misma figura se observa que la liberación de LDH al medio de incubación, está inversamente relacionada con el porcentaje de células que excluyen el azul tripán.

Sin embargo, la tinción por azul tripán y la liberación de LDH indican, solamente, lesiones celulares severas. Las células pueden tener lesiones metabólicas internas que no son reveladas por las pruebas anteriores de viabilidad, pero que pueden conducir a la muerte celular. Baur y col.(451) han seleccionado un cierto número de parámetros cuya medición da idea de la viabilidad e integridad metabólica de la célula hepática.

Nosotros hemos determinado algunos de esos parámetros en distintas preparaciones de hepatocitos cuyos resultados se describen en la Tabla X. Estos parámetros son: la glucogenolisis endógena y su estimulación por glucagon, lo que implica, además, la presencia de sitios receptores para hormonas intactos, y la síntesis de proteínas. Los resultados obtenidos sobre ambas funciones indican una óptima funcionalidad metabólica de las preparaciones de hepatocitos obtenidas, comparables, a su vez, con otras ya publicadas (402, 405).

También fue planteada la posibilidad que cualquiera de las sustancias empleadas en los distintos experimentos realizados produjera un daño en las células, que modificara la viabilidad de las suspensiones. Esta posibilidad debe ser descartada a la luz de los resultados expuestos en la Tabla XI, en la cual se ve que ninguna de las sustancias ensayadas varía significativamente el porcentaje de viabilidad de los hepatocitos, medida como la exclusión del azul tripán.

Una vez establecida la viabilidad e integridad metabólica de las suspensiones de hepatocitos de rata, se procedió a determinar, en los mismos, las actividades basales de las enzimas succinil CoA sintetasa, ALA-S, ALA-D y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450. Los valores de actividades enzimáticas y el contenido de la hemoproteína se corresponden, en forma ajustada, con aquellos obtenidos en hígado entero y publicados en la literatura por otros autores (Tabla XII). Por otra parte, se observa que

estos valores de actividad específica de ALA-S y ferroquelatasa (figura 18) y de succinil CoA sintetasa y ALA-D, se mantienen sin variaciones significativas durante las 6 horas de incubación de los hepatocitos en medio HAM F12, tiempo máximo durante el cual se realizaron los experimentos posteriores.

Sin embargo, el contenido de citocromo P-450 decae sustancialmente a lo largo de la incubación, hasta llegar a una pérdida de casi el 60%, luego de 6 horas (figura 18 B). Esta rápida declinación del citocromo P-450, en cultivos de hepatocitos, ha sido observada por otros autores (452, 453) y es contrarrestado, en general, suplementando el medio de cultivo con distintas sustancias como nicotinamida y ácido ascórbico, hormonas como insulina y dexametasona y otros factores extrahepáticos (454-456). Las proteínas del citocromo P-450 hepático y del sistema de transporte electrónico, responsable del metabolismo de muchas drogas y xenobióticos, se encuentran unidos a membranas. La disposición espacial y asociación de sus componentes deben estar estrictamente reguladas *in vivo* para asegurar que los niveles de estas hemoproteínas se mantengan constantes. El proceso de aislamiento de los hepatocitos debe producir una alteración en la regulación del citocromo P-450 que causaría la disminución de su contenido. Esta espontánea declinación del citocromo P-450, podría ser el resultado de la pérdida de un cofactor esencial o de la ausencia de un sustrato endógeno que conduciría a la autooxidación o a una destrucción autocatalizada del complejo enzimático (457).

Nosotros encontramos que la adición del dibutiril AMPc al medio de suspensión, eleva en un 50% el contenido de citocromo P-450 a las 2 horas, manteniéndolo luego constante hasta las 6 horas de incubación (figura 24 C). Este hecho, que será discutido con mayor profundidad, concuerda con observaciones preliminares realizadas por Vickers y Brendel (457) y con los informes sobre retención del contenido de citocromo P-450 en cultivos de hepatocitos por efecto del agregado de hormonas (458), que podrían actuar independientemente o vía AMPc.

La biosíntesis del hemo, en condiciones normales, está regulada para formar una cantidad precisa del hemo requerido para la síntesis de varias hemoproteínas. La acumulación de ALA y PBG es insignificante comparada con la cantidad de hemo biosintetizado, debido a la presencia de un sistema

de regulación basado, principalmente, en el efecto represor del hemo regulatorio sobre la primera enzima del camino metabólico, la ALA-S.

El nivel del pool de hemo regulatorio en los hepatocitos, refleja el equilibrio dinámico de la síntesis, utilización y degradación del hemo formado en estas células, el cual, en su mayor parte, constituye el grupo prostético del citocromo P-450. En condiciones patológicas, una síntesis incrementada o una destrucción acelerada de esta hemoproteína, inducida por ciertas drogas, medicamentos, hormonas, etc., afecta los mecanismos de regulación del camino biosintético del hemo.

Estos eventos metabólicos pueden ser simulados experimentalmente in vivo o in vitro, usando suspensiones o cultivos de hepatocitos, ofreciendo así, un modelo apropiado para el estudio del metabolismo del hemo en porfirias humanas.

En primer término, nuestros experimentos fueron tendientes a comprobar si el sistema de suspensión de hepatocitos utilizado respondía a la acción de ciertas sustancias, de características porfirinogénicas, como el AIA, fenobarbital, acetato de plomo, de un modo comparable a lo observado in vivo o en cultivos primarios. De ser así, este sistema in vitro nos permitiría estudiar mecanismos regulatorios de la biosíntesis del hemo, independientemente de la posible influencia de factores extrahepáticos.

Nuestros resultados indican que el AIA ejerce un efecto inductor sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa en las suspensiones de hepatocitos de rata (figuras 18 A y B). Resultados similares, respecto a la actividad de ALA-S, fueron obtenidos por Kim y Kikuchi (293), en hígado de rata y por Strand y col. (260), en cultivos de hepatocitos de embriones de pollo. Por otro lado, Edwards y Elliot (297) encontraron que la inducción de ALA-S mediada por AIA, en suspensiones de hepatocitos de rata, era dependiente de la presencia de dibutiril AMPc en el medio de suspensión, sin cuya presencia, el AIA no presentaba ningún efecto. Sin embargo, esta aparente discrepancia con nuestros resultados, puede deberse al alto contenido de glucosa del medio de suspensión utilizado por estos autores, complementado además, con 10% de suero fetal bovino. Como se discutirá más adelante, nosotros observamos que concentraciones de glucosa, como las utilizadas por Edwards y Elliot en el medio de suspensión, suprimen el efecto inductor del AIA sobre la actividad de ALA-S (figura 21).

También observamos, en el sistema in vitro utilizado, la inducción de ALA-S y ferroquelatasa por fenobarbital (figura 19) y la inducción de

ALA-S por plomo (figura 20). El efecto de este último sobre la actividad de ALA-S es comparable con el encontrado por Strand y col.(260) y por Maxwell y Meyer (276).

El efecto inductor del fenobarbital, sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa, es similar al que observamos sobre ambas enzimas, usando AIA como inductor. Estos resultados prueban que la última enzima de la biosíntesis del hemo, la ferroquelatasa, es inducible, como fue sugerido por Tephly y col.(343), en trabajos con hígado de rata in vivo. Este hecho, sugeriría que dicha enzima puede desempeñar un papel significativo en los mecanismos regulatorios asociados con la biosíntesis del hemo.

No detectamos efectos inductores de AIA y fenobarbital sobre las actividades de succinil CoA sintetasa y ALA-D, en las condiciones experimentales empleadas.

Con respecto al contenido de citocromo P-450, nuestros resultados muestran que la presencia de AIA, en la suspensión de hepatocitos, incrementa la degradación de esta hemoproteína (figura 18), coincidentemente con lo observado en hígado de rata por Wada y col.(459) y por Ortiz de Montellano y Mico (248). Por otra parte, publicaciones de diferentes laboratorios, basados en experiencias realizadas in vivo (343, 365) e in vitro, utilizando cultivos de hepatocitos de embriones de pollo (299), mostraron que el fenobarbital ejerce un efecto inductor sobre la biosíntesis de citocromo P-450. Este mismo hecho se observa en nuestro sistema de suspensión de hepatocitos (figura 19), indicando una formación de novo de citocromo P-450 inducido por fenobarbital y/o una disminución en la degradación de la hemoproteína, probablemente debida a la constitución de un ligando entre el fenobarbital y citocromo, como fue sugerido por Hockin y Paine (460), para derivados de piridina.

Los resultados obtenidos en los experimentos con distintas drogas inductoras, son compatibles con la hipótesis que expresa que la inducción de la enzima ALA-S, la primera y limitante de la velocidad en la biosíntesis del hemo, responde a una disminución del pool de hemo regulatorio, independientemente del mecanismo responsable de la disminución: bloqueo parcial de la formación de hemo por inhibición de la ferroquelatasa (efecto del plomo); utilización aumentada de hemo debido a una mayor síntesis de citocromo P-450 requerida para propósitos de detoxificación (efecto del fenobarbital); o aumento de la degradación del hemo como grupo prostético del citocromo P-450 (efecto del AIA).



Todos los efectos inductores observados son dependientes de la síntesis de novo de las moléculas proteicas, ya que, como se observa en la Tabla XIII, las inducciones son suprimidas por acción de una concentración de cicloheximida suficiente como para inhibir más del 95% de la síntesis proteica en los hepatocitos. Más precisamente, el efecto represor del hemo del pool regulatorio debe actuar a nivel de la transcripción, como lo sugieren los resultados presentados en la misma Tabla XIII, donde se observa la desaparición de los efectos inductores de AIA, fenobarbital y acetato de plomo, por acción de actinomicina D. Esta última conclusión coincide con lo observado por Whiting (38) en hígado de embriones de pollo y por Yamamoto y col.(266) en hígado de rata.

De los resultados expuestos se concluye que, el sistema de hepatocitos aislados utilizado, conserva la inducibilidad de ALA-S y citocromo P-450 en presencia de distintas sustancias porfirinogénicas, en forma comparable a lo observado in vivo. Además se demuestra la inducibilidad de la enzima ferroquelatasa mediada por las mencionadas sustancias. Estos hechos permiten afirmar que el sistema empleado constituye un modelo eficiente para realizar estudios in vitro de los mecanismos regulatorios relacionados con la biosíntesis del hemo.

Ya fue mencionado en el capítulo IV de la Introducción que la administración de glucosa causa un mejoramiento del cuadro clínico y una disminución de la excreción de precursores del hemo, en pacientes con algún tipo de porfiria hepática. Este efecto terapéutico está relacionado con las observaciones realizadas en hígado de ratas (295) y embriones de pollo (302), en los cuales la glucosa inhibe o suprime la inducción de ALA-S mediada por drogas. Las bases moleculares de este denominado "efecto glucosa" aun no se conocen a pesar de los extensos estudios realizados en animales enteros.

Una limitación importante para la investigación del efecto glucosa ha sido la dificultad de demostrar dicho efecto, sobre la biosíntesis del hemo, in vitro. Sólo recientemente, Giger y Meyer (299) y Schoenfeld y col.(327), en cultivos de hepatocitos de embriones de pollo, demostraron un efecto inhibitorio de la glucosa sobre la inducción de ALA-S por fenobarbital y AIA, respectivamente.

En el presente trabajo, nosotros demostramos el efecto inhibitorio

de la glucosa sobre las inducciones de ALA-S y ferroquelatasa mediadas por AIA (figura 21 A y B) o fenobarbital (figura 22 A y B) en suspensiones de hepatocitos de ratas, en forma similar a lo observado en ratas in vivo (20, 293, 295). El "efecto glucosa" es dosis dependiente (figuras 21 C y 22 C). Por otra parte, la presencia de glucosa, sin alguno de los inductores, no modifica las actividades basales de ALA-S y ferroquelatasa en la suspensión de hepatocitos (figuras 21 A y B y 22 A y B); ni agregada al homogenato de hepatocitos, afecta el ensayo in vitro de ambas actividades enzimáticas. Estos resultados, junto con la demostración que la inducción de ALA-S y ferroquelatasa es debida al aumento de la síntesis de novo de las proteínas enzimáticas (Tabla XIII), sugieren que la glucosa actúa, probablemente, inhibiendo la estimulación de la síntesis de ALA-S y ferroquelatasa.

Diversos investigadores no han podido observar este "efecto glucosa" en hepatocitos de rata (297, 461). Esta aparente contradicción, puede deberse a que estos laboratorios usaron en sus trabajos medios de cultivo conteniendo glucosa u otros hidratos de carbono suplementado con suero, insulina u otras hormonas. Es importante puntualizar que, en nuestro laboratorio, el efecto inhibitorio de la glucosa fue observado en ausencia de factores extrahepáticos y con un medio de suspensión sin glucosa.

Posteriormente fue estudiado si cualquier metabolito derivado o relacionado con la glucosa podía imitar su efecto inhibitorio. Para ello se probaron varios azúcares e intermediarios glicolíticos (Tabla XIV y XV). Sólo la fructosa y la 2-deoxiglucosa presentan efectos semejantes al de la glucosa, aunque en menor magnitud. La 2-deoxiglucosa es un análogo de la glucosa, con la que compite por la entrada al hepatocito, y no es metabolizada más allá de 2-deoxiglucosa-6-fosfato ya que, este último, inhibe la glucosa-6-fosfato isomerasa. La fructosa, por su parte, puede ser convertida a glucosa y/o entrar al camino glucolítico. Nuestros resultados sugieren que el "efecto glucosa" estaría mediado por la misma glucosa o por la glucosa-6-fosfato o por algún metabolito no glicolítico derivado de ellos. Basado en esto, es difícil explicar la ausencia de efecto inhibitorio de galactosa, manosa, glicerol, piruvato y lactato. Puede decirse, sin embargo, que la diferente eficacia de estos metabolitos en reprimir la síntesis de ALA-S y ferroquelatasa, debe estar relacionada con la permeabilidad del hepatocito hacia ellos y con el grado y velocidad en que son convertidos en glucosa dentro del hepatocito. Por ejemplo, ha sido observado que, in vitro, la fructosa es más eficientemente convertida en glucosa hepática que

el piruvato o el lactato (462). Al respecto, nuestros resultados son coincidentes con lo informado por Bonkowsky y col. (295) en experimentos en hígado de rata.

No nos fue posible detectar un efecto inhibitorio de la glucosa sobre el contenido de citocromo P-450 inducido por fenobarbital (figura 22 C y D), en contraposición con lo observado respecto de ALA-S y ferroquelatasa. Este resultado es importante en relación con la hipótesis sustentada sobre el mecanismo de inducción. A pesar de la presencia de glucosa en la suspensión de hepatocitos, el fenobarbital induce el contenido de citocromo P-450, produciendo necesariamente una disminución del pool de hemo regulador, pero que no se traduce en la inducción de ALA-S y ferroquelatasa. En otras palabras, la glucosa no interfiere la acción del fenobarbital sobre el citocromo P-450, que es el punto primario de la acción del barbitúrico, sino que interferiría en algún punto de la secuencia de eventos que transcurren entre la "orden" de desrepresión, causada por la disminución del hemo, y la síntesis de novo de las proteínas enzimáticas activas. Similares conclusiones fueron obtenidas, a partir de distintos experimentos, por Giger y Meyer en cultivos de hepatocitos de embriones de pollo (299).

Uno de los puntos importantes de nuestro trabajo fue determinar si el AMPc interviene en la regulación de la biosíntesis del hemo hepático. Los resultados presentados en la literatura al respecto son bastante divergentes y han sido comentados en el capítulo III de la Introducción. En su gran mayoría estos trabajos fueron realizados utilizando animales intactos, por lo que se puede considerar la posibilidad de que los datos experimentales informados, sean el resultado indirecto de la acción del AMPc en otros tejidos. Esta consideración no es aplicable a nuestros trabajos, en los cuales estudiamos el efecto directo del AMPc sobre células de origen hepático. Por otra parte, a pesar de que el AMPc es el compuesto intracelular de interés fisiológico, su limitada entrada a la célula lo hace de relativa eficacia en estudios realizados en suspensiones de animales. Por esta razón, en casi todos los experimentos ha sido utilizado un análogo del tipo del dibutiril AMPc.

Nuestros resultados indican claramente que el dibutiril AMPc potencia las inducciones de ALA-S y ferroquelatasa mediadas por AIA (figura 23) y fenobarbital (figura 24). Sin embargo, el agregado del derivado di-

butirflico del nucleótido cíclico, en ausencia de AIA o fenobarbital, no modifica los niveles basales de ambas actividades enzimáticas.

Observaciones realizadas en ratas in vivo no son coincidentes con nuestros resultados. Bonkowsky y col.(295) no han encontrado efecto inductor alguno, sobre la actividad de ALA-S, del AMPc o dibutiril AMPc en presencia de AIA; Kim y Kikuchi (42) por el contrario, observaron un efecto inhibitorio del AMPc sobre la inducción de ALA-S mediada por AIA. Estas discrepancias pueden deberse, en el primer caso, a que probablemente el AMPc inyectado a las ratas no fue suficiente para lograr una concentración apropiada en el hepatocito como para producir un incremento en la actividad enzimática inducida, debido a la amplia distribución y rápida metabolización de este nucleótido en el organismo (463). En el segundo caso, ha sido sugerido que los efectos del AMPc, in vivo, dependen del tiempo transcurrido entre la administración del nucleótido cíclico y la del inductor y entre éste y el de medición de la actividad enzimática (293), lo que podría hacer variar la magnitud y dirección de los efectos observados in vivo.

El contenido de citocromo P-450 inducido por fenobarbital es, también, significativamente potenciado por el agregado de dibutiril AMPc al medio de suspensión. Ya fue mencionado el hecho que el dibutiril AMPc sólo, en ausencia de fenobarbital, produce un aumento en el contenido de citocromo P-450 (figura 24). En este punto surge como consideración el hecho de porqué si, tanto el fenobarbital como el dibutiril AMPc elevan los niveles de citocromo P-450, este último no produce variación de las actividades de ALA-S y ferroquelatasa. Este diferente comportamiento podría deberse a que el fenobarbital induce la síntesis de novo de apocitocromo, produciendo así, una disminución del pool de hemo regulatorio, mientras que el dibutiril AMPc estimularía, vía fosforilación o por algún otro mecanismo, la activación de un pool de citocromo P-450 preexistente. Esta posibilidad ha sido sugerida también por Vickers y Brendel (457). En la Tabla XVI puede observarse que la inducción del citocromo P-450 por fenobarbital más dibutiril AMPc no es totalmente suprimida por actinomicina D o cicloheximida, y sí lo es la producida por fenobarbital sólo (Tabla XIII). Esto, probablemente, se deba a la activación del citocromo P-450, no dependiente de la síntesis de proteínas, como uno de los componentes de la acción del dibutiril AMPc. El otro componente sería que, en presencia de fenobarbital, el dibutiril AMPc potencie la síntesis de apocitocromo P-450 inducida por el barbitúrico.

Hasta aquí, el efecto potenciador del dibutiril AMPc sobre las actividades inducidas de ALA-S y ferroquelatasa operaría, aparentemente, a través de mejorar el efecto inductor del fenobarbital sobre el citocromo P-450 y de este modo disminuiría aun más el nivel de hemo regulatorio. Pero debemos considerar también que el dibutiril AMPc causa la potenciación de ALA-S y ferroquelatasa cuando el inductor es AIA, a pesar de que su mecanismo de acción, disminución del hemo regulatorio por incremento de su destrucción, es distinto al del fenobarbital. Este hecho implicaría que el dibutiril AMPc también actuaría sobre alguno de los sucesos que ocurren entre la disminución del hemo regulatorio y el aumento de la síntesis de ALA-S y ferroquelatasa activas. En resumen, nuestros resultados sugieren que el dibutiril AMPc actuaría estimulando la síntesis de citocromo P-450, ALA-S y ferroquelatasa y estabilizando el citocromo P-450 preexistente.

El dibutiril AMPc es metabolizado en la célula hepática en otros compuestos (464). Estos metabolitos, particularmente el butirato, pueden afectar un número de procesos celulares incluyendo la inducción de ciertas enzimas (465). Además, otros nucleótidos monofosfatos podrían tener efectos similares al del dibutiril AMPc. Por esta razón se estudió la especificidad del efecto del dibutiril AMPc sobre las inducciones de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 mediadas por el fenobarbital. Como se observa en la Tabla XVII, sólo los tres compuestos conteniendo AMPc son capaces de incrementar, significativamente, las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450 inducidos por fenobarbital. Refuerza este concepto, el hecho que el análogo no metabolizable 8-Bromo-AMPc es el más efectivo. De este modo, los incrementos observados son causados, específicamente, por los compuestos conteniendo AMPc.

Otra observación importante la constituye el hecho que el agregado de dibutiril AMPc es capaz de suprimir el efecto inhibitorio de la glucosa sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa inducidas por AIA o fenobarbital (figura 25). Es decir que, el AMPc, aparece contrarrestando el denominado "efecto glucosa", abriendo la posibilidad de que dicho efecto no sea ejercido por la glucosa o algún derivado de ella en forma directa, sino mediado por la variación de los niveles intracelulares de AMPc hepático. Resultados similares fueron obtenidos por Giger y Meyer (299) y por Scott y Edwards (324).

En este punto de la discusión es oportuno considerar los resultados obtenidos en los estudios realizados en hepatocitos provenientes de ratas diabéticas. Ya fue mencionado en el capítulo 4 de la Introducción, la relativa frecuencia de asociación entre diabetes mellitus y porfiria hepática y se planteó la posibilidad de que este hecho sea el resultado de la presencia, en pacientes diabéticos, de ciertos factores que, o bien actúen directamente sobre el metabolismo del hemo o faciliten la expresión de defectos genéticos preexistentes. Los estudios realizados en este trabajo fueron diseñados con el objeto de explorar la naturaleza de estos factores, si los hubiera, responsables del desarrollo de porfiria en ciertos pacientes diabéticos.

La diabetes experimental fue provocada por una inyección de STZ, siguiéndose, aun con mayor rigurosidad, los criterios descriptos para establecer la severidad del estado diabético (Tabla XIX). Es importante señalar que el estado diabético no afecta la cantidad de proteínas, ni su síntesis en los hepatocitos (Tabla XXV), ni la viabilidad de los mismos.

En primer lugar, nuestros resultados muestran que los contenidos de citocromo P-450 y AMPc están aumentados en los hepatocitos de ratas con diabetes experimental, comparados con los de ratas normales (Tabla XX). Con respecto al mayor nivel de AMPc endógeno, es consistente con lo encontrado por otros autores en hígado de ratas in vivo, tratadas con aloxano y STZ como agentes diabetogénicos (466, 467). El mayor contenido de citocromo P-450 en células de ratas diabéticas, muy probablemente refleja un incremento de la actividad monooxigenasa del hepatocito, como ha sido postulado por Bitar y Weiner (468, 469). Se observa también, que la disminución del contenido de citocromo P-450 en los hepatocitos de ratas diabéticas (figura 27) es, a lo largo del tiempo, menor que en los de ratas normales (figura 24 C). Esta observación confirmaría el efecto estabilizador del AMPc sobre el citocromo P-450 preexistente, debido al mayor contenido del nucleótido cíclico en los hepatocitos de animales diabéticos, y justificaría también el mayor contenido de esta hemoproteína.

Por otra parte, los resultados presentados muestran que las actividades de ALA-S y ferroquelatasa en hepatocitos de ratas tratadas con STZ, son similares a los encontrados en células de ratas normales (Tabla XX). Al respecto, Bitar y Weiner (469), han observado valores disminuidos de actividad de ALA-S hepática, luego de 44 días de la inyección de STZ, en ratas hembras. Es importante remarcar que los resultados de Bitar y Weiner fueron

obtenidos en experimentos llevados a cabo in vivo. Las diferencias entre nuestros resultados y los de estos investigadores, probablemente sean debidas a diferentes condiciones experimentales, el sexo de los animales utilizados, el número de días desde la administración del agente diabetogénico y el efecto de factores extrahepáticos.

Las inducciones de ALA-S y ferroquelatasa, mediadas por fenobarbital, es mucho mayor en los hepatocitos de ratas diabéticas que en los de animales normales (figuras 26 y 29). Si consideramos nuestra hipótesis, expuesta anteriormente, que el AMPc estimula la síntesis de novo de ALA-S y ferroquelatasa cuando hay una disminución del pool de hemo regulatorio, como ocurre en el caso del agregado de fenobarbital, es lógico esperar que el alto contenido de AMPc de la célula hepática de ratas diabéticas, favorezca una mayor inducción de ambas actividades enzimáticas. Coincidentemente con estos resultados, se observa también, una mayor inducción del citocromo P-450 mediada por fenobarbital en los hepatocitos de ratas diabéticas (figuras 27 y 29). Si el AMPc potencia la síntesis de apocitocromo P-450 inducida por el fenobarbital, este efecto se verá acentuado en el hepatocito diabético con alto contenido del nucleótido cíclico, lo que conducirá a un marcado descenso del nivel de hemo regulatorio y una rápida desrepresión de la síntesis de ALA-S y ferroquelatasa, favorecida, nuevamente, por el elevado nivel de AMPc endógeno. De este modo puede sugerirse que, la célula hepática de animales diabéticos, es más susceptible a la acción del fenobarbital debido, al menos en parte, al alto contenido de AMPc.

En favor de esta hipótesis se cuenta el hecho de que no nos fue posible demostrar un efecto potenciador de las inducciones de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 mediadas por fenobarbital, por el agregado de dibutiril AMPc en los hepatocitos de ratas diabéticas, en contrario a lo observado en los hepatocitos de animales normales (figuras 26, 27 y 29). Considerando los elevados niveles endógenos de AMPc preexistentes en los hepatocitos de ratas diabéticas, se puede especular con que la máxima inducción que es posible obtener en nuestro sistema experimental, ya es lograda por efecto del nucleótido cíclico endógeno.

Con referencia al "efecto glucosa" descrito en hepatocitos de ratas normales, nuestros resultados indican que la glucosa no ejerce efecto inhibitorio alguno sobre las inducciones de ALA-S y ferroquelatasa, mediadas por fenobarbital, en hepatocitos de ratas diabéticas. Tampoco, al igual

que en hepatocitos de ratas normales, hay efecto inhibitorio de la glucosa sobre la inducción por fenobarbital del contenido de citocromo P-450. Teniendo en cuenta que el agregado de dibutiril AMPc suprime la manifestación del "efecto glucosa" en hepatocitos de ratas normales, se puede suponer el bloqueo de dicho efecto, en los hepatocitos de ratas diabéticas, donde el contenido del nucleótido cíclico es 4 ó 5 veces mayor que en las células de ratas normales.

De la observación de estos resultados y de estudios realizados sobre el efecto represor de la glucosa sobre enzimas no relacionadas con la biosíntesis del hemo, en microorganismos (470) y en hígado de mamíferos (471), se puede sugerir que el efecto inhibitorio de la glucosa sobre las actividades inducidas de ALA-S y ferroquelatasa observada en nuestros experimentos, reflejaría una disminución en los niveles intracelulares de AMPc debido a la glucosa o a un metabolito derivado de ella, conduciendo a una menor síntesis de las proteínas enzimáticas mencionadas.

Para confrontar esta hipótesis, se estudió la variación de los niveles endógenos de AMPc por acción del fenobarbital y/o glucosa, en hepatocitos de ratas normales y diabéticas (figura 30 A y B). Los resultados obtenidos muestran claramente que el fenobarbital, en ambos hepatocitos, eleva los niveles de AMPc; mientras que la adición simultánea de glucosa junto con el barbitúrico, bloquea dicho incremento tanto en hepatocitos de ratas normales como diabéticas. La diferencia entre ambos hepatocitos es que, en los normales la glucosa bloquea totalmente el pico de AMPc, mientras que en los diabéticos hay sólo una disminución parcial. Estas observaciones indican una estrecha asociación entre la manifestación del "efecto glucosa" y los niveles de AMPc. Asumiendo que la glucosa operaría a través de un metabolito derivado de ella que disminuiría el contenido de AMPc, la incapacidad de la glucosa de inhibir totalmente el aumento de la concentración del nucleótido, provocada por el fenobarbital, sería el resultado de una menor formación de dicho metabolito como consecuencia del metabolismo anormal que opera en el estado diabético.

La medición de los niveles endógenos de AMPc en diferentes condiciones (figura 30) nos permite concluir que, si el nivel de AMPc aumenta, puede manifestarse la inducción de ALA-S y ferroquelatasa por fenobarbital, mientras que si ésta disminuye (agregado simultáneo de glucosa en hepatoci-



tos de ratas normales) la inducción de estas actividades enzimáticas se encuentra bloqueada. Esto es así a pesar de producirse, como ya se dijo, una disminución en el nivel del hemo regulatorio, por inducción del citocromo P-450, ya que la misma no es bloqueada por glucosa. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que el AMPc desempeñaría un importante papel en la inducción de ambas actividades enzimáticas. En otras palabras, la inducción de ALA-S y ferroquelatasa necesitaría de dos hechos cuyas secuencias serían: disminución del hemo regulatorio y un nivel apropiado de AMPc.

Para examinar con mayor profundidad el papel del AMPc en la inducción de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 mediada por fenobarbital, se estudiaron los efectos causados por la modulación de los niveles intracelulares de AMPc. Los agentes elegidos para modificar los niveles de AMPc fueron sustancias previamente empleadas para determinar el papel del AMPc en otros procesos biológicos, activadores e inhibidores de adenilato ciclasa y fosfodiesterasa (472).

Adrenalina y forskolina fueron utilizados como sustancias que aumentan los niveles intracelulares de AMPc a través de la activación de adenilato ciclasa, por mecanismos diferentes, dependiente e independiente de receptores, respectivamente (473). El aumento comprobado de AMPc intracelular, por agregado de adrenalina y forskolina, tiene el mismo efecto sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450, que el agregado de dibutiril AMPc al medio de incubación, en hepatocitos de ratas normales (Tabla XXI).

También fueron utilizadas sustancias que elevan el contenido de AMPc en los hepatocitos, a través de la inhibición de la enzima fosfodiesterasa (Tabla XXII). El agregado de MIX al medio de incubación de hepatocitos de ratas normales, resulta en la potenciación de las actividades inducidas de ALA-S y ferroquelatasa y del contenido de citocromo P-450 mediado por fenobarbital. Algunos autores no han encontrado este efecto utilizando inhibidores como teofilina, aminofilina y cafeína, todos ellos derivados de xantina (306). Es probable que la MIX, debido a su mayor lipofili- cidad y por lo tanto a su mayor penetrabilidad en el hepatocito, presente una mayor actividad que las otras metilxantinas mencionadas. Sin embargo, los derivados de xantinas poseen una variedad de propiedades adicionales (474), siendo posible que el efecto observado de MIX pueda estar relacionado con alguna de sus otras propiedades farmacológicas. La papaverina es un inhibidor de fosfodiesterasa que es, según ha sido publicado, de 10-1000

veces más potente que las metilxantinas (475). También la papaverina potencia las inducciones producidas por el fenobarbital (Tabla XXII). Si bien es posible que este efecto de la papaverina no esté relacionado con su acción sobre la fosfodiesterasa, el hecho que este compuesto y MIX, sustancias no relacionadas químicamente, ejerzan efectos similares al agregado de dibutiril AMPc, aumenta la probabilidad de que estas sustancias actúen a través de la inhibición de la fosfodiesterasa.

La ausencia de efecto de los activadores de adenilato ciclasa y de los inhibidores de fosfodiesterasa sobre la inducción de las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y el contenido de citocromo P-450 en hepatocitos de ratas diabéticas (Tablas XXI y XXII), coincide con la ausencia de efecto del dibutiril AMPc en dichos hepatocitos y, como ya se dijo, reflejaría el alto contenido de AMPc de las células de animales diabéticos, que hace redundante cualquier aumento adicional del nucleótido cíclico.

Sutherland y col.(476) han propuesto cuatro criterios que deben ser satisfechos para justificar que un efecto dado es mediado por AMPc. Nuestros resultados demuestran que 3 de estos 4 criterios se cumplen en nuestro sistema experimental. Si bien no se intenta comparar la acción hormonal, mediada por AMPc y descrita por Sutherland, con la inducción de la biosíntesis de hemo por fenobarbital, sí se puede sugerir, con suficiente fundamento que, luego de producido el descenso en el nivel de hemo regulatorio por incremento del contenido de citocromo P-450, la posterior inducción de ALA-S y ferroquelatasa está mediada por AMPc. Los criterios utilizados, coincidiendo con aquellos expuestos por Sutherland son: a) hay un aumento en el nivel de AMPc que precede a la manifestación del efecto (inducción de ALA-S y ferroquelatasa)(figura 31); b) se potencia el efecto por agregado de inhibidores de fosfodiesterasa (Tabla 23); c) el efecto puede manifestarse por agregado de AMPc exógeno (figura 24).

Los resultados discutidos hasta el momento presentan fuertes evidencias sobre la participación del AMPc en los mecanismos de regulación de la biosíntesis del hemo. Debemos considerar, sin embargo, si la presencia del AMPc es necesaria para que se produzca la inducción o bien si sólo la complementa, haciendo que dicha inducción sea de mayor magnitud. Para ello, se realizaron los experimentos cuyos resultados están representados en la Tabla XXIII, utilizando sustancias que disminuyen los niveles endógenos de AMPc. Ferendelli y col.(477) han demostrado que el aloxano inhibe la adenilato ciclasa en hígado, mientras que Harris y col.(478) observaron que el

imidazol estimula la fosfodiesterasa en el mismo tejido. De la observación de los resultados indicados en la Tabla XXIII, surge que el aloxano y/o el imidazol agregados a la suspensión de hepatocitos de ratas normales junto con el fenobarbital, producen una disminución del 60 al 70% del contenido de AMPc respecto del incubado conteniendo fenobarbital sólo, a las 2 horas, mientras que a las 4 horas se observa un bloqueo de las inducciones de ALA-S y ferroquelatasa y una ligera disminución de la inducción del contenido de citocromo P-450. Por otra parte, en los hepatocitos de ratas diabéticas, sólo el agregado conjunto de aloxano e imidazol produce una disminución del contenido de AMPc, significativamente por debajo del nivel de los hepatocitos normales y es éste el único caso en el cual se observa una ligera, pero significativa, disminución de las inducciones de ALA-S y citocromo P-450.

Estos resultados indican que la inducción de las actividades de ALA-S y ferroquelatasa es dependiente de la presencia de AMPc, debiendo la célula hepática contener un nivel umbral como para que dicha inducción se manifieste. Por el contrario, con respecto al citocromo P-450, el AMPc complementa la inducción producida por el fenobarbital, potenciándolo a valores mayores.

Diversos autores han observado que la adenosina inhibe las proteínquinasas de una gran variedad de tejidos, entre ellos en hígado de ratas y embriones de pollo (479). En la Tabla XXIV se observa que las inducciones de ALA-S, ferroquelatasa y citocromo P-450 son parcialmente bloqueadas por el agregado de adenosina, al medio de incubación, en hepatocitos de ratas normales y diabéticas. Estos resultados sugieren que el AMPc actuaría a través de fosforilaciones mediadas por proteínquinasas dependientes de dicho nucleótido.

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla XXV, debe descartarse un efecto inespecífico del dibutiril AMPc o de las sustancias que modifican los niveles intracelulares del nucleótido, sobre la síntesis de proteínas. Por lo tanto, el papel del AMPc en la regulación de la biosíntesis del hemo, parecería ser relativamente específico, dado que concentraciones óptimas de dibutiril AMPc y de otras sustancias, no tienen efecto significativo sobre la síntesis general de proteínas, tanto en suspensiones de hepatocitos de ratas normales como diabéticas.

En la figura 31 se han resumido los resultados de varios experimentos, para observar los efectos del fenobarbital sobre las actividades de ALA-S y ferroquelatasa y los contenidos de citocromo P-450 y AMPc y la incorporación de leucina- $H^3$ , en función del tiempo. Se puede ver de este modo, que la sucesión de eventos, a partir del agregado de fenobarbital, es coincidente con la hipótesis sustentada: el aumento en el contenido de citocromo P-450, que disminuye el pool de hemo regulatorio, y el aumento de AMPc, que permite la inducción de ALA-S y ferroquelatasa, preceden al incremento de las actividades de ambas enzimas.

Por último, hemos estudiado también, el efecto del dibutiril AMPc y glucosa sobre la translocación, de citoplasma a mitocondria, de la enzima ALA-S inducida por fenobarbital, en hepatocitos de ratas normales (Tabla XXVI) y diabéticas (Tabla XXVII). Nosotros observamos que, en hepatocitos de ratas normales, el fenobarbital produce un aumento de ALA-S en ambas fracciones pero que es, proporcionalmente, mayor en citoplasma. Este efecto fue observado por Kim y Kikuchi (293) en ratas in vivo, utilizando AIA como inductor. El dibutiril AMPc afecta la distribución de la enzima inducida favoreciendo, aparentemente, el transporte de la proteína a la mitocondria, mientras que la glucosa inhibe la inducción de ALA-S en ambas fracciones.

El efecto del AMPc activando la translocación de ALA-S se ve confirmado observando los resultados obtenidos en células de animales diabéticos. En éstas, el fenobarbital no produce una acumulación de ALA-S en citoplasma tan marcada como en los hepatocitos de ratas normales, sugiriéndose la posibilidad que el elevado nivel de AMPc existente en el hepatocito de los animales diabéticos, favorezca el transporte a mitocondrias, sin necesidad de agregado exógeno del nucleótido.

De acuerdo a estos resultados el AMPc favorecería la conversión de ALA-S citosólica a mitocondrial, estimulando su transporte o procesamiento o ambos. Ha sido descrita la participación del AMPc estimulando el transporte de proteínas a través de membranas interviniendo, en general, a través de fosforilaciones mediadas por proteínquinasas dependientes de nucleótidos cíclicos (480).

## Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo indican claramente que el AMPc desempeña un papel importante en la regulación de la biosíntesis del hemo en hepatocitos de rata. En primer lugar, el AMPc estabilizaría el contenido de citocromo P-450 y potenciaría la síntesis de apocitocromo P-450 inducido por fenobarbital. De este modo, el AMPc al aumentar la síntesis de la hemoproteína colaboraría para profundizar la disminución del pool de hemo regulatorio. Sin embargo, este efecto tendría influencia sobre la biosíntesis del hemo, dependiendo del inductor que se utilice, es decir, con sustancias que induzcan la síntesis de citocromo P-450. Si bien este efecto es importante, no actúa, sino indirectamente, sobre el mecanismo general de inducción del camino metabólico, o sea, sobre la desrepresión de la síntesis de ALA-S por disminución del nivel de hemo regulatorio, mecanismo ya ampliamente aceptado (28, 253-256). Pero además de este efecto sobre el citocromo P-450, hemos demostrado que el AMPc es necesario para producir la inducción de la síntesis de ALA-S y ferroquelatasa, actuando en algún punto entre la disminución del hemo regulatorio y la síntesis proteica de las enzimas activas. De acuerdo a nuestros resultados, el AMPc actuaría, presumiblemente, debido a su capacidad para promover la fosforilación de diversos componentes celulares por proteínquinasas dependientes de dicho nucleótido cíclico, como ha sido sugerido por Wicks (290). La demostración de la necesidad de la presencia de AMPc para que se produzca la inducción de ALA-S y ferroquelatasa, sugiere que, el mecanismo regulatorio de la biosíntesis del hemo, requiere de dos elementos indispensables: un cierto nivel de hemo intracelular (pool de hemo regulatorio) y un determinado contenido de AMPc.

La hipótesis de que el AMPc induce la síntesis de proteínas específicas por aumento de la traducción de una cantidad fija de mRNA (290) ha sido completamente reevaluada, a partir de fines de la década del 70, a la luz de los resultados obtenidos con enzimas tales como fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (286), tirosina aminotransferasa (287), fosfatasa alcalina (288) y otras. Estos trabajos sugieren que la traducción no sería el sitio primario de acción del AMPc. Sin embargo, como la actividad traduccional in vitro de un mRNA puede ser, teóricamente, modificada por alteración de la velocidad de transcripción, procesamiento ("splicing" de los exones), modificaciones (poliadenilación, metilación, "capping"), degradación o activación de un pool preexistente de mRNA inactivo, son varios los posibles si-

tios de acción del nucleótido cíclico. Si bien nuestros resultados no permiten identificar el mecanismo y el sitio preciso de acción del AMPc, favorecen la hipótesis de un efecto pretraduccional.

De acuerdo a esto se debería contemplar la posibilidad que el AMPc tuviera un sitio de acción en el núcleo, en las células eucariontes, como ha sido sugerido para los mRNA de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (481) y prolactina (482). Podría considerarse también, la posibilidad, de acuerdo a la hipótesis de Kuo y Greengard (483), que el AMPc actúe a través de una proteínaquinasa que fosforile una proteína regulatoria, actuando esta como represor, activo en su forma defosforilada. Alternativamente, se podría sugerir un mecanismo similar al de las bacterias (319), por el cual el AMPc se une a una proteína regulatoria que interactúa con la cromatina, produciendo el aumento de mRNA específico. También se debe considerar la posibilidad de que el transporte de mRNA específico a citoplasma, sea incrementado por el AMPc, como ha sido sugerido para enzimas no relacionadas con la biosíntesis del hemo (484). La dilucidación de el o los mecanismos involucrados requerirá mediciones directas de cada una de las etapas en la generación de los mRNA de ALA-S y ferroquelatasa.

Como el último de los efectos del AMPc demostrados en el presente trabajo, pero no por ello el menos importante, se encuentra la estimulación del transporte de la enzima ALA-S de citosol a mitocondria. Por ser este último, el sitio fisiológico de acción de esta enzima, ya que allí se encuentra el sustrato succinil CoA, la acumulación de ALA-S en mitocondrias provocará la inducción de la biosíntesis del hemo en los hepatocitos. También en este caso, la sugerencia sobre el papel desempeñado por el AMPc, brinda una explicación racional a las diferencias observadas en cuanto a la distribución subcelular de ALA-S, inducida por fenobarbital, en hepatocitos de ratas normales y diabéticas. Sin embargo, no nos es posible descartar la posibilidad que el estado de diabetes experimental, provoque una mayor permeabilidad de la mitocondria hacia la enzima ALA-S, sin intervención directa del AMPc.

Se ha analizado además el denominado "efecto glucosa", que suprime la inducción de ALA-S y ferroquelatasa mediada por AIA o fenobarbital. Al respecto, es importante señalar que el mencionado efecto ha sido observado en ausencia de factores extrahepáticos, contraponiéndose a la hipótesis que sostiene que la glucosa no actuaría directamente sobre la célula hepática, sino modulando el cociente insulina/glucagon en plasma y modificando, de

este modo, los niveles de AMPc hepático (306). Nuestros resultados, por el contrario, demuestran una acción directa de la glucosa sobre los hepatocitos, sugiriéndose que, dicho efecto, operaría a través de la disminución de los niveles endógenos de AMPc, mediado por la misma glucosa o, probablemente, por un derivado de ella. Esta hipótesis ofrecería una explicación a los efectos contrapuestos observados del AMPc y la glucosa.

Los datos experimentales presentados en este trabajo demuestran que las células hepáticas de ratas con diabetes experimental por STZ, exhiben diferencias significativas comparadas con los hepatocitos de animales normales. Los elevados niveles de citocromo P-450 y AMPc, sumado a la respuesta aumentada a la estimulación por fenobarbital de citocromo P-450, ALA-S y ferroquelatasa y la ausencia de "efecto glucosa", sugieren que el camino metabólico del hemo, en hepatocitos de ratas diabéticas, es marcadamente susceptible a la acción de factores porfirinogénicos. Nuestros resultados indican que el alto contenido de AMPc de la célula hepática sería uno de los factores, con toda seguridad no el único, que determinaría esa mayor sensibilidad a la acción del fenobarbital, por ejemplo. De este modo, el estado diabético presentaría un terreno apropiado para el desencadenamiento de porfiria en pacientes portadores de un defecto genético en el metabolismo del hemo, al ser expuestos a algún factor porfirinogénico endógeno o exógeno. Una explicación similar podría ser sugerida para otras enfermedades, como los síndromes idiopáticos autoinmunes, asociadas con la porfiria (485, 486).

Otra importante observación realizada en el presente trabajo es la inducibilidad de la enzima ferroquelatasa. Si bien ya había sido sugerido en trabajos realizados in vivo (343), no hay publicados resultados similares en sistemas in vitro. Es de destacar que la actividad de ferroquelatasa es modificada, en general, en forma paralela a las variaciones sufridas por la ALA-S. Los efectos del dibutiril AMPc y la glucosa son similares para ambas actividades enzimáticas, así como su comportamiento en hepatocitos de ratas normales y diabéticas.

Estos resultados sugerirían que la ferroquelatasa podría estar involucrada en los mecanismos regulatorios de la biosíntesis del hemo, constituyéndose en un punto secundario de control. La inducción de ferroquelatasa tendría sentido si se considera que actuaría para elevar el nivel de hemo regulatorio, disminuido por el aumento de la síntesis de citocromo P-450 (en el caso del fenobarbital) y así restablecer el control "feedback"

negativo sobre ALA-S. Esta hipótesis se hace más atrayente, considerando los estudios realizados sobre la localización submitocondrial de la primera y última enzimas del camino biosintético. La ALA-S, la enzima limitante de la velocidad de síntesis, se encuentra en la matriz (33), mientras que la ferroquelatasa se halla en la membrana interna, orientada hacia la matriz (184). Kappas y col.(185) han sugerido que la localización de la ferroquelatasa, en estrecha proximidad con ALA-S, podría permitir un control muy fino de la actividad de esta enzima por el hemo.



## BIBLIOGRAFIA

**BIBLIOGRAFIA**

- 1) BURNHAM, B.F. en *Metabolic Pathways* 3ra.ed.(1969) (David M. Greenberg, editor) Vol. 3 Cap. 18 Academic Press N.Y.
- 2) MAUZERALL, D. y GRANICK, S. *J. Biol. Chem.* 232 (1958), 1141-1155.
- 3) BOGORAD, L. *J. Biol. Chem.* 233 (1958), 516-526.
- 4) BRIDGER, W.A. in *The Enzymes* 3ra.ed.(1974) (Paul D. Boyer, editor) Vol. 10, 581-606 Academic Press N.Y.
- 5) NISHIMURA, J.S. en *Advances in Enzymology and related areas of molecular biology* (1986) (A. Meister, editor) Vol. 58, 141-172 John Wiley and Son N.Y.
- 6) LABBE, R.F., KURUMADA, T. y ONISAWA, J. *Biochem. Biophys. Acta* 111 (1965), 403-415.
- 7) KAUFMAN, S. y ALIVISATOS, S.G.A. *J. Biol. Chem.* 216 (1955), 141-152.
- 8) WIDER DE XIFRA, E.A., MENDIARA, S. y BATLLE, A.M.C. *FEBS Lett.* 27 (1972), 275-278.
- 9) WOLOUDKO, W.I., O'CONNOR, M.D. y BRIDGER, W.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 2140-2144.
- 10) CHA, S., CHA, C.J.M. y PARKS, R.E. *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 2582-2592.
- 11) ALLEN, D.A. y O'HAWAY, J.H. *FEBS Lett.* 194 (1986), 1/1-1/5.
- 12) VOGEL, H.J. y BRIDGER, W.A. *J. Biol. Chem.* 257 (1982), 4834-4842.
- 13) BRIDGER, W.A. *Curr. Top. Cell. Regul.* 24 (1984), 345-355.
- 14) NISHIMURA, J.S. y MITCHEL, T. *J. Biol. Chem.* 260 (1985), 2077-2079.
- 15) BUCK, D., SPENCER, M.E. y GUEST, J.R. *Biochemistry* 24 (1985), 6245-6252.
- 16) BUCK, D., SPENCER, M.E. y GUEST, J.R. *J. Gen. Microbiol.* 132 (1986), 1753-1762.
- 17) KIKUCHI, G., KUMAN, A. IALMAGE, P. y SHEMIN, D. *J. Biol. Chem.* 233 (1958), 1214-1221.
- 18) TALL, G.H. *Biochem. J.* 131 (1973), 389-395.

- 19) GIBSON, K.D., LAVER, W.G. y NEUBERGER, A. *Biochem. J.* 70 (1958), 77-81.
- 20) MARVER, H.S., COLLINS, A., TSCHUDY, D.P. y RECHCIGL, M. *J. Biol. Chem.* 241 (1966), 4323-4329.
- 21) AOKI, Y., WADA, O., URATA, G., TAKAKU, F. y NAKAO, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42 (1971), 568-575.
- 22) NEUBERGER, A.P. *Biochem. J.* 78 (1961), 1-10.
- 23) SCHULMAN, J.P. y RICHERT, D.A. *J. Biol. Chem.* 226 (1957), 181-187.
- 24) SCHOLNIK, P.L., HAMMAKER, L.E. y MARVER, H.S. *J. Biol. Chem.* 247 (1972), 4132-4137.
- 25) AKHIAK, M., ABBOUD, M.M., BARNARD, G., JORDAN, P. y ZAMAN, Z. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 273 (1976), 117-136.
- 26) GRANICK, S. y KAPPAS, S. en *Metabolic Regulation* (1977) (Vogel, H.J., editor), 77-141. Academic Press N.Y.
- 27) GRANICK, S. y URAIA, G. *J. Biol. Chem.* 238 (1963), 821-828.
- 28) GRANICK, S. *J. Biol. Chem.* 241 (1966), 1359-1374.
- 29) TSCHUDY, D.P., PERLROTH, M.G., MARVER, H.S., COLLINS, A., HUNTER, G. y RECHCIGL, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53 (1965), 841-849.
- 30) SCHOLNICK, P.L., HAMMAKER, L.E. y MARVER, H.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63 (1969), 65-70.
- 31) WHITING, M.J. y ELLIOT, W.H. *J. Biol. Chem.* 247 (1972), 6818-6826.
- 32) MCKAY, R., DRUYAN, R., GEIZ, G.S. y RABINOWITZ, M. *Biochem. J.* 114 (1969), 455-461.
- 33) SCOTTO, A.W., CHANG, L.L. y BEATTIE, D.S. *J. Biol. Chem.* 258 (1983), 81-90.
- 34) HAYASHI, N., YODA, B. y KIKUCHI, G. *Arch. Biochem. Biophys.* 131 (1969), 83-91.
- 35) IGARASHI, J., HAYASHI, N. u KIKUCHI, G. *J. Biochem.* 80 (1976), 1091-1099.
- 36) OHASHI, A. y KIKUCHI, G. *Arch. Biochem. Biophys.* 153 (1972), 34-46.
- 37) GONZALEZ-CADAVID, N.F. y DE CORDOVA, C.S. *Biochem. J.* 140 (1974), 157-167.

- 38) WHITING, M.J. *Biochem. J.* 158 (1976), 391-400.
- 39) YAMAUCHI, K., HAYASHI, N. y KIKUCHI, G. *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 1746-1751.
- 40) OHASHI, A. y KIKUCHI, G. *J. Biochem.* 85 (1979), 239-347.
- 41) OHASHI, A. y SINOHARA, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 84 (1978), 76-82.
- 42) NAKAKUKI, M., YAMAUCHI, K., HAYASHI, N. y KIKUCHI, G. *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 1738-1745.
- 43) SRIVASTAVA, G., BORTHWICK, I.A., BROOKER, J.D., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109 (1982), 313-319.
- 44) SIMPSON, D.M. y BEATTIE, D.S. *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 1630-1634.
- 45) WHITING, M.J. y GRANICK, S. *J. Biol. Chem.* 251 (1976), 1340-1346.
- 46) WHITING, M.J. y GRANICK, S. *J. Biol. Chem.* 251 (1976), 1347-1353.
- 47) SRIVASTAVA, G., BORTHWICK, I.A., BROOKER, J.D., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110 (1983), 23-31.
- 48) WATANABE, N., HAYASHI, N. y KIKUCHI, G. *Arch. Biochem. Biophys.* 232 (1984), 118-126.
- 49) KENG, T., ALANI, E. y GUARENTE, L. *Mol. Cell. Biol.* 6 (1986), 355-364
- 50) BEATTIE, D.S., SCOTTO, A.W., REDDY, U., DeLOSKEY, R. y BOSCH, C.G. *Arch. Biochem. Biophys.* 236 (1985), 311-320.
- 51) AKOI, Y. *J. Biol. Chem.* 253 (1978), 2026-2032.
- 52) PATERNITI, J.R., SIMONE, J.J. y BEATTIE, D.S. *Arch. Biochem. Biophys.* 189 (1978), 86-91.
- 53) BRIGGS, D.W., CONDIE, L.W., SEDMAN, R.M. y TEPHLY, T.R. *J. Biol. Chem.* 251 (1976), 4996-5001.
- 54) LIEN, L. y BEATTIE, D.S. *Arch. Biochem. Biophys.* 215 (1978), 171-178.
- 55) PATERNITI, J.R., LIN, C.P. y BEATTIE, D.S. *Arch. Biochem. Biophys.* 191 (1978), 792-797.
- 56) SARDESAL, V.M., LENAGHAN, R. y ROSENBERG, J.C. *Biochem. Med.* 6 (1972), 366-371.
- 57) TOFILON, P.J. y PIPER, W.N. *Arch. Biochem. Biophys.* 201 (1980), 104-109.

- 58) CONDIE, L.W., BARON, J. y TEPHLY, T.R. Arch. Biochem. Biophys. 172 (1976), 123-129.
- 59) MOORE, M.R., THOMPSON, G.G., PAYNE, A.P. y MCGADEY, J. Biochem. Soc. Trans. 5 (1977), 1475-1478.
- 60) YAMAMOTO, M., FUJITA, H., WATANABE, N., HAYASHI, N. y KIKUCHI, G. Arch. Biochem. Biophys. 245 (1986), 76-83.
- 61) MEYER, U.A. y SCHMID, R. en The metabolic basis of inherited diseases (1978) (Stanbury, J.B., editor), pp 1166-1204, McGraw-Hill Books N.Y.
- 62) WOODS, J.S. Mol. Pharmacol. 10 (1974), 389-397.
- 63) WOODS, J.S. y MURTHY, V.V. Mol. Pharmacol. 11 (1975), 70-78.
- 64) BORTHWICK, I.A., SRIVASTAVA, G., HOBBS, A.A., PIROLA, B.A., BROODER, J.D., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. Eur. J. Biochem. 144 (1984), 95-99.
- 65) BORTHWICK, I.A., SRIVASTAVA, G., DAY, A.R., PIROLA, B.A., SNOSWELL, M., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. Eur. J. Biochem. 150 (1985), 481-484.
- 66) MAGUIRE, D.J., DAY, A.R., BORTHWICK, I.A., SRIVASTAVA, G., WIGLEY, P.L., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. Nucleic Acid Research 14 (1986), 1379-1391.
- 67) YAMAMOTO, M., YEW, N.S., FEDERSPIEL, M., DOUGSON, J.B., HAYASHI, N y ENGEL, J.D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 3702-3706.
- 68) GRANICK, S. y MAUZERALL, D. J. Biol. Chem. 232 (1958), 1119-1126.
- 69) HO, Y.K. y LASCELLES, J. Arch. Biochem. Biophys. 144 (1971), 734-740.
- 70) MUTHUKRISHNAN, S., MALATHI, K. y PADMANABAN, G. Biochem. J. 129 (1972), 31-37.
- 71) SHETTY, A.S. y MILLER, G.W. Biochem. J. 114 (1969), 331-337.
- 72) SHEMIN, D. y RUSSELL, C.S. J. Am. Chem. Soc. 75 (1953), 4873-4874.
- 73) BATTLE, A.M.C., FERRAMOLA, A.M. y GRINSTEIN, M. Biochem. J. 104 (1967), 204-212.
- 74) GIBBS, P.N.B., CHAUDHRY, A.G. y JORDAN, P.M. Biochem. J. 230 (1985), 25-34.
- 75) NANDI, D.L. y SHEMIN, D. J. Biol. Chem. 243 (1968), 1236-1242.
- 76) GIBBS, P.N.B. y JORDAN, P.M. Biochem. J. 236 (1986), 447-451.

- 77) BATLLE, A.M.C. y STELLA, A.M. *Int. J. Biochem.* 9 (1978), 861-864.
- 78) BARNARD, G.F., ITOH, R., HOHBERGER, L.H. y SHEMIN, D. *J. Biol. Chem.* 252 (1977), 8965-8974.
- 79) GIBSON, K.D., NEUBERGER, A. y SCOLL, J.J. *Biochem. J.* 61 (1955), 618-625.
- 80) DE BRUIN, A. *Med. Lavoro* 59 (1968), 411-419.
- 81) FINELLI, V.N., KLAUDER, D.S., KARAFFA, M.A. y PETERING, H.G. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65 (1975), 303-310.
- 82) WU, W.H., SHEMIN, D., RICHARDS, K.E. y WILLIAMS, R.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974), 1767-1773.
- 83) SHEMIN, D. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244 (1975), 348-379.
- 84) BURNHAM, B.F. y LASCELLES, J. *Biochem. J.* 87 (1963), 462-472.
- 85) SHEMIN, D. en *The Enzymes*, 3ra. edición (1974) (Paul D. Boyer, editor) Vol III, pp 323-337, Academic Press N.Y.
- 86) CHEN, A. y NEILANDS, J.B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55 (1973), 1060-1065.
- 87) BEVAN, D.R., BODLAENDER, P. y SHEMIN, D. *J. Biol. Chem.* 255 (1980), 2030-2035.
- 88) ISUKAMOTO, I., YOSHINAGA, I. y SANO, S. *Biochim. Biophys. Acta* 570 (1979), 167-178.
- 89) SEEHRA, J.S., GORE, M.G., CHAUDHRY, A.G. y JORDAN, P.M. *Eur.J. Biochem.* 114 (1981), 263-269.
- 90) JAFFE, E.K. y HANES, D. *J. Biol. Chem.* 261 (1986), 9348-9353.
- 91) GIBBS, P.N., GORE, M. y JORDAN, P.M. *Biochem. J.* 225 (1985), 573-580.
- 92) COLEMAN, D.L. *J. Biol. Chem.* 241 (1966), 5511-5517.
- 93) DOYLE, D. y SCHMIKE, R.T. *J. Biol. Chem.* 244 (1969), 5449-5459.
- 94) MOORE, M.R. *Clin. in Haematol.* 9 (1980), 227-252.
- 95) WEIMUR, J.G., BISHOP, D.E., CANIELMO, C. y DESNICK, R.J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986), 7703-7707.
- 96) LLAMBIAS, E.B.C. y BAILLE, A.M.C. *Biochem. J.* 121 (1971), 327-340.

- 97) SANCÓVICH, H.A., BATLLE, A.M.C. y GRINSTEIN, M. *Biochem. Biophys. Acta* 191 (1969), 130-143,
- 98) KOHASHI, M., CLEMENT, R.P., TSE, J. y PIPER, W.N. *Biochem. J.* 220 (1984), 755-765.
- 99) HART, G., LEEPER, F. y BATTERSBY, A. *Biochem. J.* 222 (1984), 93-102.
- 100) FRYDMAN, R.B. y FEINSTEIN, G. *Biochem. Biophys. Acta* 350 (1974), 358-370.
- 101) HIGUCHI, M. y BOGORAD, L. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244 (1975), 401-418.
- 102) BOGORAD, L. *J. Biol. Chem.* 233 (1958), 501-513.
- 103) FRYDMAN, B., FRYDMAN, R.B., VALASINAS, A., LEVY, E.S. y FEINSTEIN, G. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 273 (1976), 137-160.
- 104) FRYDMAN, R.B., REIL, S. y FRYDMAN, B. *Biochemistry*, 10 (1971), 1154-1160.
- 105) BATTERSBY, A.R. y McDONALD, E. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 273 (1976) 161-180.
- 106) BATTERSBY, A.R. y McDONALD, E. *Acc. Chem. Res.* 12 (1979), 14-22.
- 107) BATTERSBY, A.R., FOOKES, J.R., GUSTAFSON-POTTER, K.E., MATCHAM, G.W. y McDONALD, E. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* (1979), 1155-1158.
- 108) BATTERSBY, A.R., FOOKES, C.J.R., GUSTAFSON-POTTER, K.E., McDONALD, E. y MATCHAM, G.W. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* (1982), 2413-2426.
- 109) ANDERSON, P.C., BATTERSBY, A.R., BROADBENI, H.A., FOOKES, C.J.R. y HARI, G.J. *Tetrahedron* 42 (1986), 3123-3136.
- 110) BURTON, G., FAGERNESS, P.E., HOSUZAWA, S., JORDAN, P.M. y SCOTT, A.I. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* (1979), 202-204.
- 111) BURTON, G., NORDLOV, H., HOSUZAWA, S., MATSUMOTO, H., JORDAN, P.M., FAGERNESS, P.E., PRYDE, L.M. y SCOTT, A.I. *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979), 3114-3116.
- 112) JORDAN, P.M., BURTON, G., NORDLOV, H., SCHNEIDER, M.M., PRYDE, L.M., y SCOTT, A.I. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* (1979), 204-205.
- 113) EVANS, J.N.S., DAVIES, R.C., BOYD, A.S.F., ICHINOSE, I., MACKENZIE, N., SCOTT, A.I. y BAXTER, R.L. *Biochemistry* 25 (1986), 896-904.
- 114) EVANS, J.N.S., BURTON, G., FAGERNESS, P.E., MACKENZIE, N., y SCOTT, A.I. *Biochemistry* 25 (1986), 905-912.

- 115) JONES, C., JORDAN, P.M. y AKHTAR, M. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I 11 (1984), 2625-2629.
- 116) LOCKWOOD, W.H. y RIMINGTON, C. Biochem. J. 67 (1957), 8-16.
- 117) GARCIA, R.C., SAN MARTIN DE VIALE, L.C., TOMIO, J.M. y GRINSTEIN, M. Biochim. Biophys. Acta 309 (1973), 203-210.
- 118) TAIRA, M.C. y SAN MARTIN DE VIALE, L.C. Enzyme 31 (1984), 79-89.
- 119) RASMUSSEN, G.L. y KUSHNER, J.P. J. Lab. Clin. Med. 93 (1979), 54-59.
- 120) DE VERNEUIL, H., SASSA, S. y KAPPAS, M. J. Biol. Chem. 258 (1983), 2454-2459.
- 121) KUSHNER, J.P., BARBUTO, A.J. y LEE, G.R. J. Clin. Invest. 58 (1976), 1089-1095.
- 122) KUSHNER, J.P., STEINMULLER, D.P. y LEE, G.R. J. Clin. Invest. 56 (1975) 661-670.
- 123) MUKERJI, S.K. y PIMSTONE, N.R. Arch. Biochem. Biophys. 244 (1986), 619-629.
- 124) STRAKA, J.G. y KUSHNER, J.P. Biochemistry 22 (1983), 4664-4672.
- 125) SAN MARTIN DE VIALE, L.C. y GRINSTEIN, M. Biochim. Biophys. Acta. 158 (1968), 79-87.
- 126) JACKSON, A.H., SANCOVICH, H.A., FERRAMOLA, A.M., EVANS, W., GAMES, D.E., MATLIN, S.A., ELDER, G.H. y SMITH, S.G. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 273 (1976), 191-206.
- 127) SMITH, A.G. y FRANCIS, J.E. Biochem. J. 183 (1979), 455-458.
- 128) ELDER, G.H., TOVEY, J.A. y SHEPPARD, D.M. Biochem. J. 215 (1983), 45-51.
- 129) ELDER, G.H. y URQUHART, A.J. Biochem. Soc. Trans. 12 (1984), 663-664.
- 130) GRANDCHAMP, B., ROMEO, P.H., DE VERNEUIL, H., DUBART, A., GOOSSENS, M. ROSA, J. y NORDMANN, Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. 118 (1984), 378-382.
- 131) ROMEO, P.H., DUBART, A., GRANDCHAMP, B., DE VERNEUIL, H., ROSA, J., NORDMANN, Y. y GOOSSENS, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), 3346-3350.
- 132) ROMEO, P.H., RAICH, N., DUBART, A., BEAUPAIN, D., PRYOR, M., KUSHNER, J. COHEN-SOLAL, M. y GOOSSENS, M. J. Biol. Chem. 261 (1986), 9825-9831.



- 133) SANO, S. y GRANICK, S. J. Biol. Chem. 236 (1961), 1173-1178.
- 134) POULSON, R. y POLGLASE, W.J. J. Biol. Chem. 249 (1974), 6367-6371.
- 135) GRANICK, S. y MAUZERALL, D. Ann. N.Y. Acad. Sci. 75 (1958), 115-144.
- 136) BAILLE, A.M.C., BENSON, A.M. y RIMINGTON, C. Biochem. J. 97 (1965), 731-740.
- 137) ELDER, G.H. y EVANS, O. Biochem. J. 172 (1978), 345-347.
- 138) KENNEDY, G.Y., JACKSON, A.H., KENNER, G.W. y SUCKLING, C.J. FEBS Lett. 6 (1970), 9-12.
- 139) JACKSON, A.H., ELDER, G.H. y SMITH, S.G. Int. J. Biochem. 9 (1978), 887-882.
- 140) BAITERSBY, A.R., McDONALD, E., WURZIGER, H.K.W. y JAMES, K.J. J. Chem. Soc. Chem. Commun. (1975), 493-494.
- 141) ZAMAN, Z. y AKHTAR, M. Eur. J. Biochem. 61 (1976), 215-223.
- 142) CAMADRO, J.M., CHAMBON, H., JOLLES, J. y LABBE, P. Eur. J. Biochem. 156 (1986), 579-587.
- 143) POULSON, R. y POLGLASE, W.J. J. Biol. Chem. 250 (1975), 1269-1274.
- 144) POULSON, R. J. Biol. Chem. 251 (1976), 3730-3733.
- 145) JACKSON, A.H., GAMES, D.E., COUCH, P., JACKSON, J.R., BELCHER, R.B. y SMITH, S.G. Enzyme 17 (1974), 81-87.
- 146) CAMADRO, J.M., ABRAHAM, N.G. y LEVERE, R.D. Arch. Biochem. Biophys. 242 (1985), 206-212.
- 147) GRANDCHAMP, B., PHUNG, N. y NORDMANN, Y. Biochem. J. 176 (1978), 97-102.
- 148) DEYBACH, J.C., DASILVA, V., GRANDCHAMP, B. y NORDMANN, Y. Eur. J. Biochem. 149 (1985), 431-435.
- 149) POULSON, R. y POLGLASE, W.J. FEBS Lett. 40 (1974), 258-260.
- 150) KOLAROV, J., NELSON, B.D. y KUZELA, S. Biochem. Biophys. Res. Commun. 116 (1983), 383-387.
- 151) TOKUNAGA, R. y SANO, S. Biochim. Biophys. Acta 264 (1972), 263-271.
- 152) KASSNER, R.J. y WALCHAK, H. Biochim. Biophys. Acta 304 (1973), 294-303.

- 153) PORRA, R.J. y LASCELLES, J. *Biochem. J.* 108 (1968), 343-348.
- 154) LLAMBIAS, E.B.C. *Int. J. Biochem.* 7 (1976), 33-40.
- 155) TAKETANI, S. y TOKUNAGA, R. *Eur. J. Biochem.* 127 (1982), 443-447.
- 156) JONES, M.S. y JONES, O.I.G. *Biochem. J.* 119 (1970), 453-462.
- 157) DAILEY, H.A. *J. of Bacteriol.* 132 (1977), 302-307.
- 158) DAILEY, H.A. *J. Biol. Chem.* 257 (1982), 14714-14718.
- 159) BROWN, S.B., HOLROYD, J.A., VERNON, D.I. y JONES, O.I.G. *Biochem. J.* 220 (1984), 861-863.
- 160) LABBE, P., VOLLAND, C. y CHAIX, P. *Biochim. Biophys. Acta* 159 (1968), 527-539.
- 161) JONES, O.T.G. *Biochem. J.* 107 (1968), 113-119.
- 162) NISHIDA, G. y LABBE, R.F. *Biochim. Biophys. Acta* 31 (1959), 519-524.
- 163) PORRA, R.J. y JONES, O.I.G. *Biochem. J.* 87 (1963), 181-185.
- 164) HANSON, J.W. y DAILEY, H.A. *Biochem. J.* 222 (1984), 695-700.
- 165) BOTTOMLEY, S.S. *Blood* 31 (1968), 314-322.
- 166) LANGELAAN, D.E., LOSOWSKY, M.S. y TOOTHILL, C. *Clin. Chim. Acta* 26 (1969), 245-251.
- 167) CAMADRO, J.M., IBRAHAM, N.G. y LEVERET, R.D. *J. Biol. Chem.* 259 (1984) 5678-5682.
- 168) JONES, M.S. y JONES, O.T.G. *Biochem. J.* 113 (1969), 507-514.
- 169) MAILER, K., POULSON, R., DOLPHIN, D. y HAMILTON, A.D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96 (1980), 777-784.
- 170) TAKEIANI, S. y TOKUNAGA, R. *J. Biol. Chem.* 256 (1981), 12748-12753.
- 171) MAZANOWSKA, A.M., NEUBERGER, A. y TALL, G.H. *Biochem. J.* 98 (1966), 117-127.
- 172) SIMPSON, D.M. y POULSON, R. *Biochim. Biophys. Acta* 482 (1977), 461-469.
- 173) DAILEY, H.A. y FLEMING, J.E. *J. Biol. Chem.* 258 (1983), 11453-11459.
- 174) TAKETANI, S. y TOKUNAGA, R. *Biochim. Biophys. Acta* 798 (1984), 226-230

- 175) LABBE, R.F. y HUBBARD, N. *Biochim. Biophys. Acta* 41 (1960), 185-191.
- 176) LABBE, R.F. y NIELSEN, L. en *Porphyrins in human diseases* (1976) (Doss, M., editor) pp. 141-19/ Kager, Basel.
- 177) PORRA, R.J. y JONES, O.T.G. *Biochem. J.* 87 (1963), 186-192.
- 178) HONEYBOURNE, C.L., JACKSON, J.I. y JONES, O.T.G. *FEBS Lett.* 98 (1979), 207-210.
- 179) SINCLAIR, P., GIBBS, A.H., SINCLAIR, J.F. y DE MATTEIS, F. *Biochem. J.* 178 (1979) 529-538.
- 180) PORRA, R.J., VITOLS, K.S., LABBE, R.F. y NEWTON, N.A. *Biochem. J.* 104 (1967), 221-227.
- 181) DAILEY, H.A. *J. Biol. Chem.* 259 (1984), 2711-2715.
- 182) DAILEY, H.A., FLEMING, J.E. y HARBIN, B.M. *J. Bacteriol.* 165 (1986), 1-5.
- 182a) DAILEY, H.A. y FLEMING, J.E. *J. Biol. Chem.* 261 (1986), 7902-7905.
- 183) DAILEY, H.A. *Biochemistry* 24 (1985), 1287-1291.
- 184) HARBIN, B.M. y DAILEY, H.A. *Biochemistry* 24 (1985), 366-370.
- 185) KAPPAS, A., SASSA, S. y ANDERSON, K. en *The metabolic basis of inherited diseases*, 4ta. edición (1983) (Stansbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. y Brown, M.S., editores) pp. 1301-1384 McGraw-Hill Books N.Y.
- 186) TENHUNEN, R. *Ann. Clin. Res.* 8 (1976), 2-9.
- 187) KIKUCHI, G. y YOSHIDA, T. *Mol. Cell. Biochem.* 53/54 (1983), 163-183.
- 188) BAKKEN, A.F., THALER, M.M. y SCHMID, R. *J. Clin. Invest.* 51 (1972), 530-536.
- 189) BISSEL, D.M. y HAMMAKER, L.E. *Biochem. J.* 166 (1977), 301-304.
- 190) GUZELIAN, P.S. y ELSHOUBAGY, N.A. *Arch. Biochem. Biophys.* 196 (1979), 178-185.
- 191) DRUMMOND, G.S. y KAPPAS, A. *J. Exp. Med.* 153 (1981), 245-256.
- 192) SHIBAHARA, S., YOSHIDA, T. y KIKUCHI, G. *J. Biochem.* 88 (1980), 45-50
- 193) BRESLOW, E., CHANDRA, R. y KAPPAS, A. *J. Biol. Chem.* 261 (1986), 3135-3141.

- 194) SHIBAHARA, S., MULLER, R., TAGUCHI, H. y YOSHIDA, T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985), 7865-7869.
- 195) HEME CLEAVAGE: Biological systems and chemical analogs in Porphyrins and Metalloporphyrins (1981) (Smith, K.M., editor) pp. 123-153 Elsevier Amsterdam.
- 196) WHITE, R.E. y COON, M.J. Ann. Rev. Biochem. 49 (1980), 315-356.
- 197) LU, A.Y.H. Drug Metabolism Reviews 10 (1979), 187-208.
- 198) NELSON, S.D. J. Med. Chem. 25 (1982), 753-760.
- 199) DOLPHIN, D., JAMES, B.R. y WELBORN, H.C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 88 (1979), 415-421.
- 200) GROVES, J.T. J. Chem. Education 62 (1985), 928-931.
- 201) OMURA, T. y SATO, R. J. Biol. Chem. 239 (1964), 2379-2385.
- 202) GUENGERICH, F.P., DANNAN, G.A., WRIGHT, S.T., MARTIN, M.V. y KAMINSKY, L.S. Xenobiotica 12 (1982), 701-716.
- 203) ORON, L. y BAR-NUN, S. Biochim. Biophys. Acta 805 (1984), 291-299.
- 204) TYSON, C.A., LIPSCOMB, J.D. y GUNSALUS, I.C. J. Biol. Chem. 247 (1972), 5777-5782.
- 205) GABRIAC, B., BENVENISIE, I. y DURST, F. Comptes Rendus 301 (1985), 753-755.
- 206) WATERMAN, M.R. y ESTABROOK, R.W. Mol. Cell. Biochem. 53/54 (1983), 267-278.
- 207) GUENGERICH, F.P. y McDONALD, T.L. Acc. Chem. Res. 17 (1984), 9-16.
- 208) GUENGERICH, F.P. Biochemistry 22 (1983), 2811-2815.
- 209) PETERSON, J.A., WHITE, R.A., YASUKOCHI, Y., COUMES, M.L., O'KEEFE, R.E., EBEL, R.E., MASTERS, B.S.S., BSLLOU, D.P. y COON, M.J. J. Biol. Chem. 252 (1977), 4431-4437.
- 210) VERMILION, J.L., BALLOU, D.P., MASSEY, V. y COON, M.J. J. Biol. Chem. 256 (1981), 266-270.
- 211) TUCKEY, R.C. y KAMIN, H. J. Biol. Chem. 257 (1982), 9039-9042.
- 212) LU, A.Y.H. y WEST, S.B. Pharmacol. Ther. Part A 2 (1978), 337-344.

- 213) GROVES, J.T., HAUSHALTER, R.C., NAKAMURA, M., NEMO, T.E. y EVANS, B.J. J. Am. Chem. Soc. 103 (1981), 2884-2886.
- 214) LU, A.Y.H. y COON, M.J. J. Biol. Chem. 243 (1968), 1331-1332.
- 215) GUENGERICH, F.P. Biochem. Soc. Trans. 12 (1984), 68-70.
- 216) CONNEY, A.H., MILLER, E.C. y MILLER, J.A. J. Biol. Chem. 228 (1957), 753-776
- 217) CONNEY, A.H., DAVISON, C., GASTER, R. y BURNS, J.J. J. Pharm. Exp. Ther. 130 (1960), 1-8.
- 218) REMMER, H. y MERKER, H.J. Ann. N.Y. Acad. Sci. 123 (1965), 73-97.
- 219) COOPER, D.Y., LEVINE, S., NARASIMHULU, S., ROSENTHAL, O. y ESTABROOK, R.W. Science 147 (1965), 400-402.
- 220) DEHLINGER, P.J. y SCHIMKE, R.I. J. Biol. Chem. 247 (1972), 1257-1264.
- 221) JACOB, S.T., SCHARF, M.B. y VESSEL, E.S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 (1974), 704-707.
- 222) CHENG, K.C. y SCHENKMAN, J.B. J. Biol. Chem. 257 (1982), 2378-2385.
- 223) THOMAS, P.E., REIDY, J., REIK, L.M., RYAN, D.E., KOOP, D.R. y LEVIN, W. Arch. Biochem. Biophys. 235 (1984), 239-247.
- 224) BANSAL, S.K., LOVE, J.H. y GURTOO, H.L. Eur. J. Biochem. 146 (1985), 23-33.
- 225) WAXMAN, D.J. en Cytochrome P-450: Structure, mechanism and biochemistry (1986) (Ortiz de Montellano, P.R., editor) Plenum, N.Y.
- 226) WEST, S.B., HUANG, M.T., MIWA, G.T. y LU, A.Y.H. Arch. Biochem. Biophys. 193 (1979), 42-48.
- 227) BHAT, K.S. y PADMANABAN, G. FEBS Lett. 89 (1978), 337-340.
- 228) PHILLIPS, I.R., SHEPHARD, E.A., MITANI, F. y RABIN, B.R. Biochem. J. 196 (1981), 839-851.
- 229) PICKETT, C.B., TELAKOWSKI-HOPKINS, C.A., BONOHVE, A.M., LU, A.Y.H. y HALES, B.F. Biochem. Biophys. Res. Commun. 104 (1982), 611-619.
- 230) DUBOIS, R.N. y WATERMAN, M.R. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90 (1979), 150-157.
- 231) KUMAR, A., RAPHAEL, C. y ADESNIK, M. J. Biol. Chem. 258 (1983), 11280-11284.

- 232) PIKE, R.J. *Biochem. Pharmacol.* 34 (1985), 2489-2496.
- 233) FUJII-KURIYAMA, Y., MIZUKAMI, Y., SOGAWA, K. y MURAMATSU, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982), 2793-2797.
- 234) YUAN, P.M., RYAN, D.E., LEVIN, W. y SHIVELY, J.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983), 1169-1173.
- 235) ATCHISON, M. y ADESNIK, M. *J. Biol. Chem.* 258 (1983), 11285-11295.
- 236) NEBERT, D.W., NEGISHI, N., LANG, M.A., HJELMELAND, L.M. y EISEN, H.J. *Adv. Genet.* 21 (1982), 1-52.
- 237) GOLDSTEIN, J.A. *Trends Pharmacol. Sci.* 5 (1984), 290-293.
- 238) MEIER, P.J., GASSER, R., HAURI, H.P., STIEGER, B. y MEYER, U.A. *J. Biol. Chem.* 259 (1984), 10194-10200.
- 239) BAR-NUM, S., KREIBACH, G., ADESNIK, M., ALTERMAN, L., NEGISHI, M. y SABATINI, D.D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 965-969.
- 240) YAMAMOTO, A., MASAKI, R. y TASHIRO, Y. *J. Cell. Biol.* 101 (1985), 1733-1740.
- 241) SABATINI, D.D., KREIBACH, G., MORIMOTO, I. y ADESNIK, M. *J. Cell. Biol.* 92 (1982), 1-22.
- 242) DE MATTEIS, F. *Pharmacol. Rev.* 19 (1967), 523-557.
- 243) LU, A.Y.H. y WEST, S.B. *Pharmacol. Rev.* 31 (1980), 277-295.
- 244) SAKAI, H., HINO, Y. y MINAKAMI, S. *Biochem. J.* 215 (1983), 83-89.
- 245) SCHUETZ, E.G., WRIGHTON, S.A., SAFE, S.H. y GUZELIAN, P.S. *Biochemistry* 25 (1986), 1124-1133.
- 246) DE MATTEIS, F. *Biochem. J.* 124 (1971), 767-777.
- 247) RIFKIND, A.B., TROEGER, M. y MUSCHICK, H. *J. Biol. Chem.* 257 (1982), 11717-11727.
- 248) ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. y MICO, B.A. *Arch. Biochem. Biophys.* 206 (1981), 43-50.
- 249) ORON, L. y BAR-NUM, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125 (1984), 1096-1102.
- 250) BROOKER, J.D. y O'CONNOR, R. *Eur. J. Biochem.* 129 (1982), 325-333.
- 251) RIFKIND, A.B. *J. Biol. Chem.* 254 (1979), 4636-4644.

- 252) BROOKER, J.D., SRIVASTAVA, G., BORTHWICK, I.A., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. Eur. J. Biochem. 136 (1983), 327-332.
- 253) MARVER, H.S., TSCHUDY, D.P., PERLROTH, M.G. y COLLINS, A. J. Biol. Chem. 241 (1966), 2803-2809.
- 254) GRANICK, S. y BEALE, S.I. Adv. Enzymol. 46 (1978), 33-203.
- 255) GRANICK, S., SINCLAIR, P., SASSA, S. y GRIENINGER, G. J. Biol. Chem. 250 (1975), 9215-9225.
- 256) BONKOWSKY, H.L., HEALEY, J.F., SINCLAIR, P.R., MAYER, Y.P. y ERNY, R. Biochem. J. 188 (1980), 289-295.
- 257) WOLFSON, S.J., BARICZAK, A. y BLOOMER, J.R. J. Biol. Chem. 254 (1979), 3543-3546.
- 258) PIROLA, B.A., SRIVASTAVA, G., BORTHWICK, I.A., BROOKER, J.D., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. FEBS Lett. 166 (1984), 298-300.
- 259) JACOB, F. y MONOD, J. Symp. Quant. Biol. 26 (1961), 193-235.
- 260) STRAND, L.J., MANNING, J. y MARVER, H.S. J. Biol. Chem. 247 (1972), 2820-2827.
- 261) TOMIYA, Y., OHASHI, A. y KIKUCHI, G. J. Biochem. 75 (1974), 1007-1015.
- 262) HAYASHI, N., TERASAWA, M., YAMAUCHI, K. y KIKUCHI, G. J. Biochem. 88 (1980), 1537-1543.
- 263) YAMAMOTO, M., HAYASHI, N. y KIKUCHI, G. Biochem. Biophys. Res. Commun. 115 (1983), 225-231.
- 264) ADES, I.Z. Biochem. Biophys. Res. Commun. 110 (1983), 42-47.
- 265) SRIVASTAVA, G., BROOKER, J.D., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. Biochem. J. 188 (1980), 781-788.
- 266) YAMAMOTO, M., HAYASHI, N. y KIKUCHI, G. Biochem. Biophys. Res. Commun. 105 (1982), 985-990.
- 267) HAYASHI, N., KURASHIMA, Y. y KIKUCHI, G. Arch. Biochem. Biophys. 148 (1972), 10-21.
- 268) HAYASHI, N., WATANABE, N. y KIKUCHI, G. Biochem. Biophys. Res. Commun. 115 (1983), 700-706.
- 269) SRIVASTAVA, G., BORTHWICK, I.A., BROOKER, J.D., WALLACE, J.C., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 117 (1983), 344-349.

- 270) GASSER, S.M., DAUM, G. y SCHAIZ, G. J. Biol. Chem. 257 (1982), 13034-13041.
- 271) SCHLEYER, M., SCHMIDT, B. y NEUPERT, W. Eur. J. Biochem. 125 (1982), 109-116.
- 272) BADAWEY, A.B. Biochem. Soc. Trans. 7 (1979), 575-583.
- 273) GRAYZEL, A.I., HORCHNER, P. y LONDON, I.M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55 (1966), 650-655.
- 274) COLLERAN, E.M., y JONES, O.T.G. Biochem. J. 134 (1973), 89-94.
- 275) GIGER, U. y MEYER, U.A. Biochem. J. 198 (1981), 321-329.
- 276) MAXWELL, J.D. y MEYER, U.A. Eur. J. Clin. Invest. 6 (1976), 373-377.
- 277) RAVISHANKAR, H. y PADMANABAN, G. Biochem. J. 229 (1985), 73-79.
- 278) RAVISHANKAR, H. y PADMANABAN, G. J. Biol. Chem. 260 (1985), 1588-1592.
- 279) LIM, L.K., SRIVASTAVA, G., BROOKER, J.D., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. Biochem. J. 190 (1980), 519-526.
- 280) SINCLAIR, J.F., ZAILLIN, L.M., SMITH, E.L., HOWELL, S.K., BONKOWSKY, H.L. y SINCLAIR, P.R. Biochem. J. 234 (1986), 405-411.
- 281) BADAWEY, A.A.B. y MORGAN, C.J. Biochem. J. 186 (1980), 763-772.
- 282) BADAWEY, A.A.B. Biochem. J. 202 (1982), 807-808.
- 283) BADAWEY, A.A.B., WELCH, A.N. y MORGAN, C.J. Biochem. J. 206 (1982), 441-449.
- 284) BADAWEY, A.A.B. y MORGAN, C.J. Biochem. J. 206 (1982), 451-460.
- 285) WICKS, W.D. Science 160 (1968), 997-998.
- 286) BEALE, E.G., KAIZEN, C.S. y GRANNER, D.K. Biochemistry 20 (1981), 4878-4883.
- 287) ERNEST, M.J. y FEIGELSON, P. J. Biol. Chem. 253 (1978), 319-322.
- 288) FIRESTONE, G. y HEATH, E. J. Biol. Chem. 256 (1981), 1396-1403.
- 289) DERDA, D., MILES, M., SCHWEPPE, J. y JUNGSMANN, R. J. Biol. Chem. 255 (1980), 11112-11121.
- 290) WICKS, W.D. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 4 (1974), 335-438.



- 291) NELSON, K., CIMBALA, M. y HANSON, R. J. Biol. Chem. 255 (1980), 8509-8515.
- 292) KIM, H.J. y KIKUCHI, G. J. Biochem. 71 (1972), 923-926.
- 293) KIM, H.J. y KIKUCHI, G. Arch. Biochem. Biophys. 164 (1974), 293-304.
- 294) YAMAMOTO, M., HAYASHI, N. y KIKUCHI, G. Biochem. Int. 5 (1982), 747-754.
- 295) BONKOWSKY, H.L., COLLINS, A., DOHERTY, J.M. y ISCHUDY, D.P. Biochim. Biophys. Acta 320 (1973), 561-576.
- 296) SASSA, S. y KAPPAS, A. J. Biol. Chem. 252 (1977), 2428-2436.
- 297) EDWARDS, A.M. y ELLIOT, W.H. J. Biol. Chem. 249 (1974), 851-855.
- 298) SRIVASTAVA, G., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90 (1979), 42-49.
- 299) GIGER, U. y MEYER, U.A. J. Biol. Chem. 256 (1981), 11182-11190.
- 300) FRIEDLAND, D.M. y ADES, I.Z. FEBS Lett. 191 (1985), 117-120.
- 301) SYEPHENS, J.K., FISCHER, P.N.F. y MARKS, G.S. Biochem. Pharmacol. 27 (1978), 2439-2445.
- 302) KORINEX, J. y MOSES, H.L. Biochem. Biophys. Res. Commun. 53 (1973), 1246-1252.
- 303) DeLUSKEY, R.J. y BEATTIE, D.S. Arch. Biochem. Biophys. 233 (1984), 64-71.
- 304) PILKIS, S.J., CLAUS, T.H., JOHNSON, R.A. y PARK, C.R. J. Biol. Chem. 250 (1975), 6328-6336.
- 305) SEITZ, J.H., MULLER, M.J., NORDMEYER, P., KRONE, W. y IARNOWSKI, W. Endocrinology 99 (1976), 1313-1318.
- 306) MARKS, G.S., STEPHENS, J.K., FISCHER, P.W.F. y MORGAN, R.O. Mol. Cell. Biochem. 25 (1979), 111-123.
- 307) GRANICK, S. y KAPPAS, A. J. Biol. Chem. 242 (1967), 4587-4593.
- 308) GOLDBERG, A., MOORE, M.R., BEATTIE, A.D., HALL, P.E., McCALLUM, J. y GRANT, J.K. Lancet i (1969), 115-118.
- 309) ANDERSON, K.E., BRADLOW, H.L., SASSA, S. y KAPPAS, A. Am. J. Med. 66 (1979), 644-650.

- 310) BRADLOW, H.L., GILLETTE, P.N., GALLAGHER, T.F. y KAPPAS, A. J. Exp. Med. 138 (1973), 754-763.
- 311) KAPPAS, A., BRADLOW, H.L., BICKERS, D.R. y ALVAREZ, A.P. J. Clin. Invest. 59 (1977), 159-164.
- 312) ANDERSON, K.E., FREDDARA, U. y KAPPAS, A. Arch. Biochem. Biophys. 217 (1982), 597-608.
- 313) EDWARDS, A.M. y ELLIOT, W.H. J. Biol. Chem. 250 (1975), 2750-2755.
- 314) BOCK, K.W., KRAUS, E. y FRÖHLING, W. Eur. J. Biochem. 23 (1971), 366-371.
- 315) TSCHUDY, D.P., WELLAND, F.H., COLLINS, A. y HUNTER, G. Metabolism 13 (1964), 396-406.
- 316) ULLMAN, A. y DANCHIN, A. en Advances in Cyclic Nucleotides Res. (1983) (P. Greengard y G.A. Robison, editores) Vol. XV, pp. 1-55 Raven Press N.Y.
- 317) MARKMAN, R.S. y SUTHERLAND, E.W. J. Biol. Chem. 240 (1965), 1309-1314.
- 318) ZUBAY, G. Cell. Biol. 3 (1980), 154-214.
- 319) PASTAN, I. y ADHYA, S. Bacteriol. Rev. 40 (1976), 527-551.
- 320) PERAINO, C. y PITOT, H.C. J. Biol. Chem. 239 (1964), 4308-4313.
- 321) BEALE, E.G., HARILEY, J.L. y GRANNER, D.K. J. Biol. Chem. 257 (1981), 2022-2028.
- 322) KIOUSSIS, D., RESHEF, L., COHEN, H., TILGHMAN, S.M., IYNEDJIAN, P.B., BALLARD, F.J. y HANSON, R.W. J. Biol. Chem. 253 (1978), 4327-4332.
- 323) HICKMAN, R., SAUDERS, S.J., DOWDLE, E. y EALES, L. Biochim. Biophys. Acta 161 (1968), 197-204.
- 324) SCOTT, C.D. y EDWARDS, A.M. Proc. Aust. Biochem. Soc. 14 (1981), 70.
- 325) BOCK, K.W., WEINER, R. y SCHULTZ, J. Enzyme 21 (1976), 488-494.
- 326) FISCHER, P.W.F., STEPHENS, J.K. y MARKS, G.S. Molec. Pharmacol. 14 (1978), 717-721.
- 327) SCHOENFELD, N., GREENBLAI, Y., EPSTEIN, O., LAHAV, M., BEIGEL, Y. y ATSMON, A. FEBS Lett. 138 (1982), 277-279.
- 328) SCHOENFELD, N., GREENBLAI, Y., EPSTEIN, O., BEIGEL, Y. y ATSMON, A. Metabolism 34 (1985), 106-111.
- 329) POULSON, R. y POLGLASE, W.J. FEBS Lett. 40 (1974), 258-260.

- 330) TEPHLY, T.R., WAGNER, G., SEDMAN, R. y PIPER, W. Fed. Proc. 37 (1978), 35-38.
- 331) GRANICK, J.L., SASSA, S. y KAPPAS, A. Adv. Clin. Chem. 20 (1978), 287-339.
- 332) McCOLL, K.E.L. y GOLDBERG, A. Clin. Haematol. 9 (1980), 427-446.
- 333) PIROLA, B.A., BORIHWICK, I.A., SRIVASTAVA, G., MAY, B.K., y ELLIOT, W.H. Biochem. J. 222 (1984), 627-630.
- 334) BECKING, G.C. Med. Clin. North. Am. 60 (1976), 813-830.
- 335) SCOPPA, P., ROUMENGOUS, M. y PENNING, W. Experientia 29 (1973), 970-972.
- 336) MAINES, M.D. y KAPPAS, A. Biochem. J. 154 (1976), 125-131.
- 337) STEIN, J.A., TSCHUDY, D.P., CORCORAN, L.P. y COLLINS, A. J. Biol. Chem. 245 (1970), 2213-2218.
- 338) BONKOWSKY, H.L., SINCLAIR, P.R. y SINCLAIR, J.F. Yale J. Biol. Med. 52 (1979), 13-37.
- 339) KUSHNER, J.P., STEINMULLER, D.P. y LEE, G.R. J. Clin. Invest. 56 (1975) 661-667.
- 340) SHEDLOFSKY, S.I., BONKOWSKY, H.L., SINCLAIR, P.R., SINCLAIR, J.F., BEMENT, W.J. y POMEROY, J.S. Biochem. J. 212 (1983), 321-330.
- 341) DEMAIHEIS, F. y GIBBS, A.H. Biochem. J. 162 (1977), 213-216.
- 342) MAINES, M.D. y SINCLAIR, P.R. J. Biol. Chem. 252 (1977), 219-223.
- 343) TEPHLY, T.R., HASEGAWA, E. y BARON, J. Metabolism 20 (1971), 200-214.
- 344) GUZELIAN, P.S. y BISSEL, D.M. J. Biol. Chem. 251 (1976), 4421-4427.
- 345) LODOLA, A. FEBS Lett. 123 (1981), 137-140.
- 346) MOORE, M.R., McCOLL, K.E.L. y GOLDBERG, A. Diabete et Metabolisme 5 (1979), 323-336.
- 347) HINDMARSH, J.I. Clin. Chem. 32 (1986), 1255-1263.
- 348) SASSA, S. y KAPPAS, A. Adv. Hum. Gen. 11 (1981), 121-129.
- 349) RIMINGTON, C. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 45 (1985), 291-297.
- 350) BONKOWSKY, H.L. y SCHADY, W. Sem. Liver Disease 2 (1982), 108-123.

- 351) ELDER, G.H. *Brit. J. Dermatol.* 108 (1983), 729-734.
- 352) McCOLL, K.E.L. y GOLDBERG, A. *Biochem. Soc. Trans.* 11 (1983), 631-632.
- 353) STRAND, L.J., FELSHER, B.F., REDKER, A.G. y MARVER, H.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67 (1970), 1315-1320.
- 354) MEISLER, M., WANNER, L., EDDY, R.E. y SHOWS, T.B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95 (1980), 170-175.
- 355) GOLDBERG, A. *Brit. Med. J.* 291 (1985), 499-501.
- 356) ANDERSON, P.M., REDDY, R.M., ANDERSON, K.E. y DESNICK, R.J. *J. Clin. Invest.* 68 (1981), 1-8.
- 357) HAWK, J.L.M., MAGNUS, I.A., PARKES, A., ELDER, G.H. y DOYLE, M. *J. Roy. Soc. Med.* 71 (1978), 775-778.
- 358) BECKER, D.M., VILJOEN, J.D., KATZ, J. y KRAMER, S. *Brit. J. Haematol.* 36 (1977), 171-179.
- 359) DEYBACH, J.C., DEVERNEUIL, H. y NORDMANN, Y. *Human Genetics* 58 (1981), 426-431.
- 360) FELSHER, B.F., CARPIO, N.M., ENGLEKING, D.W. y NUNN, A.T. *N. Eng. J. Med.* 306 (1982), 766-769.
- 361) DEVERNEUIL, H., AIKEN, G. y NORDMANN, Y. *Human Genetics* 42 (1978), 145-151.
- 362) ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R., OLMOS, A., PEÑA, M.L., BERGES, L. y PERPIÑA, J. *Arch. Dermatol. Res.* 227 (1985), 8-12.
- 363) ELDER, G.H., SHEPPARD, D.M., ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R. y OLMOS, A. *Clin. Sci.* 58 (1980), 477-480.
- 364) SMITH, A., FRANCIS, J.E. y GREIG, J.B. *Biochem. Pharmacol.* 34 (1985), 1817-1820.
- 365) WAINSIOK DE CALMANOVICI, R., RIOS DE MOLINA, M.C., TAIRA DE YAMASATO, M.C., TOMIO, J.M. y SAN MARTIN DE VIALE, L.C. *Biochem. J.* 218 (1984), 753-763.
- 366) MUKERJI, S.K. y PIMSTONE, N.R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127 (1985), 517-525.
- 367) MUKERJI, S.K. y PIMSTONE, N.R. *Arch. Biochem. Biophys.* 244 (1986), 619-629.
- 368) MUKERJI, S.K., PIMSTONE, N.R. y TAN, K. *FEBS Lett.* 189 (1985), 217-220.

- 369) BONKOWSKY, H.L., BLOOMER, J.R., EBERT, P.S. y MAHONEY, M.J. J. Clin. Invest. 56 (1975), 1139-1146.
- 370) SASSA, S., ZALAR, G.L., POH-FITZUAIRICK, M.B., ANDERSON, K.E. y KAPPAS, A. J. Clin. Invest. 69 (1982), 809-815.
- 371) MOORE, M.R., THOMPSON, G.G., GOLDBERG, A., IPPEN, H., SEUBERT, A. y SEUBERT, S. Int. J. Biochem. 9 (1978), 933-938.
- 372) NORDMANN, Y. y DEYBACH, J.C. Sem. Liver Disease 2 (1982), 154-164.
- 373) WITH, T.K. Dan. Med. Bull. 18 (1971), 112-115.
- 374) MARKS, G.S., KRUPPA, V., MURPHY, F., TAUB, H. y BLATTNER, R.A. Ann. N. Y. Acad. Sci. 244 (1975), 472-490.
- 375) GRANICK, J.L., SASSA, S., GRANICK, S., LEVERE, R.D. y KAPPAS, A. Biochem. Med. 8 (1973), 149-152.
- 376) RENOLD, A.E., STAUFFACHER, W. y CAHILL, G.F. en *The Metabolic Basis of Inherited Diseases* (1978) (Stanbury, J.B., editor) pp. 83-118 McGraw-Hill Books N.Y.
- 377) STEINBERG, A.G. Diabetes 10 (1961), 269-282.
- 378) NEEL, J.V. Diabetes pp. 78 *International Congress Series Vol. 72S* (1969) Excerpta Medica Foundation, Amsterdam.
- 379) ORTEN, J.M. y NEUHAUS, O.W. en *Bioquímica Humana* (1984) (10ma. edición) pp. 824-826 Editorial Panamericana, Buenos Aires.
- 380) NILSSON, S.E. Acta Genet. 14 (1964), 97-102.
- 381) STERLING, K., SILVER, M. y RICKELIS, H.T. Arch. int. Med. 84 (1949), 965-975.
- 382) BURNHAM, T.K. y FOSSNAUGH, R.P. Arch. Derm. 83 (1961), 717-722.
- 383) GOERZ, G. y KORDA, S. Z. Haut. 52 (1977), 1165-1174.
- 384) OKAMOTO, H. Mol. Cell. Biochem. 37 (1981), 43-61.
- 385) YAMAMOTO, H., UCHIGAI, Y. y YAMAMOTO, N. Nature 294 (1981), 284-286.
- 386) KIM, Y.T. y STEINBERG, C. Diabetes 33 (1984), 771-777.
- 387) PAIK, S.G., FLEISCHER, N. y SHIN, S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 6129-6133.

- 388) BUSCHARD, K., MADSBAD, S. y RYGAARD, J. *Lancet* 1 (1978), 908-910.
- 389) HOGEBROOM, G.H. *Methods in Enzymology* Vol I (1955), 16-19.
- 390) GOLDBERG, A. *British J. Haematol.* 5 (1959), 150-160.
- 391) WARBURG, O. y CHRISTIAN, W. *Biochem. Z.* 310 (1941), 384-421.
- 392) LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. *J. Biol. Chem.* 193 (1951), 265-275.
- 393) WORTHINGTON ENZYME MANUAL (1972), Worthington Biochemical Corporation, Freehold, New Jersey.
- 394) TEREZSI, H.F., ROSELLINO, E. y PASSERUN, S. *Eur. J. Biochem.* 18 (1971), 342-348.
- 395) HUGGEL, A. y NIXON, D. *Biochem. J.* 66 (1957), 12-21.
- 396) LAEMMLI, U.K. *Nature (Lon.)* 227 (1970), 68-685.
- 397) PLOWMAN, K.M. in *Enzyme Kinetics* (1971), pp. 118-123. McGraw-Hill
- 398) LINEWEAVER, H. y BURK, D. *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934), 658-670.
- 399) SAWADA, H., TAKESHIMA, M., SUGITA, Y. y YONEYAMA, Y. *Biochim. Biophys. Acta* 178 (1969), 145-155.
- 400) FALK, J.E. in *Porphyrins and Metalloporphyrins* (1964), Elsevier, N.Y.
- 401) RIMINGTON, C. *Biochem. J.* 75 (1960), 620-631.
- 402) SEGLEN, P.O. *Methods in Cell Biology* 13 (1976), 29-83.
- 403) FRY, J.R., JONES, C.A., WIEBKIN, P., BELLEMANN, P. y BRIDGES, J.W. *Anal. Biochem.* 71 (1976), 341-350.
- 404) SEGLEN, P.O. *Exp. Cell. Res.* 74 (1972), 450-454.
- 405) PAUL, J. in *Cell and Tissue Culture* (1970), 4ta. ed. Livingstone, Edinburgh.
- 406) DUBOWSKI, K.M. *Clin. Chem.* 8 (1962), 215-235.
- 407) MOLDEUS, P., HOGBERG, J. y ORRENIUS, S. in *Methods in Enzimol.* (1978), (Fleischer, S. y Packer, L., editores) Vol 52, pp. 60-71, Academic Press, N.Y.
- 408) SEDGWICK, K.A. y FRIEDEN, C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32 (1968), 392-397.

- 409) TSANG, C.P.W., LEHOTAY, D.C. y PEARSON MURPHY, B.E. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 35 (1972), 809-817.
- 410) CANTORE, M.L., GALVAGNO, M.A. y PASSERON, S. *Cell. Biol. Int. Rep.* 7 (1983), 947-954.
- 411) CAJONE, F. y BERNELLI-ZAZZERA, A. *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984), 725-729.
- 412) LODOLA, A., NEWSAM, R.J. y SUMNER, J.G. *Anal. Biochem.* 117 (1981), 45-52.
- 413) JUNOD, A., LAMBERT, A.E., ORCI, L., PICIETI, R., GONET, A.E. y RENOLD, A.E. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126 (1967), 201-205.
- 414) STEINER, D.F. *Vit. Horm.* 24 (1966), 1-61.
- 415) GIBSON, K.D., NEUBERGER, A. y SCOTT, J.J. *Biochem. J.* 61 (1955), 618-629.
- 416) SIMON, E.J. y SHEMIN, D. *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953), 2520-2521.
- 417) ZAMAN, Z., JORDAN, P.M. y AKHTAR, M.B. *Biochem. J.* 135 (1973), 257-263.
- 418) MOLDEUS, P., GRUNDIN, R., VonBAHR, C. y ORRENIUS, S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55 (1973), 937-944.
- 419) OMURA, T. y SATO, R. *J. Biol. Chem.* 239 (1964), 2370-2378.
- 420) ESTABROOK, R.W. y WERRINGLOER, J. in *Methods in Enzymol.* (1978), (Fleischer, S. y Packer, L., editores) Vol. 52, pp. 212-220, Academic Press, N.Y.
- 421) STRAND, D.L., SWANSON, A.L., MANNING, J., BRANCH, S. y MARVER, H.S. *Anal. Biochem.* 47 (1972), 457-470.
- 422) KAUFMAN, K. y MARVER, H.S. *N. Eng. J. Med.* 283 (1970), 954-958.
- 423) PORRA, R.J. y ROSS, B.D. *Biochem. J.* 94 (1965), 557-562.
- 424) BRADFORD, H.F., SWANSON, P.D. y GAMMACK, D.B. *Biochem. J.* 92 (1964), 247-254.
- 425) HAIEFI, Y. y HANSTEIN, W.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 62 (1969), 1129-1136.
- 426) SINGER, S.J. y NICOLSON, G.L. *Science*, 175 (1972), 720-731.
- 427) BENNETT, J.P. in *Techniques in the Life Sciences* (1982), Vol. B 4, pp. 1-22, Elsevier, N.Y.

- 428) HELENIUS, A. y SIMONS, K. *Biochim. Biophys. Acta* 415 (1975), 29-79.
- 429) TANFORD, C. y REYNOLDS, J.A. *Biochim. Biophys. Acta* 457 (1976), 133-170.
- 430) ENGELMAN, D.M. y ZACCAI, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 5894-5898.
- 431) ROODYN, D.B. *Biochem. J.* 85 (1962), 177-189.
- 432) KOLLER, M.E., ROMSLO, I. y FLATMARK, T. *Biochim. Biophys. Acta* 449 (1976), 480-490.
- 433) CANEPA, E.T. y LLAMBIAS, E.B.C. *Enzyme* 26 (1981), 288-295.
- 434) DIXON, M. y WEBB, E.C. in *Enzymes* 2da. ed. (1971), Longman, Londres.
- 435) GOLDIN, B.R. y LITTLE, H.N. *Biochim. Biophys. Acta* 171 (1969), 321-332.
- 436) NEUBERGER, A. y TAIT, G.H. *Biochem. J.* 90 (1964), 607-616.
- 437) KORNBLIHTI, A.R., FLAWIA, M.M. y TORRES, H.N. *Biochemistry* 20 (1981), 1262-1269.
- 438) BOYER, P.D. *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954), 4331-4337.
- 439) RIORDAN, J.F. y VALLEE, B.L. in *Methods in Enzymol.* (1972), Vol 25, pp. 449-456 Academic Press, N.Y.
- 440) CHAN, W.W.C. *Biochemistry* 7 (1968), 4247-4254.
- 441) WEBB, J.L. in *Enzyme and Metabolic Inhibitors* (1966), Vol. 3, Academic Press, N.Y.
- 442) ASANO, A., KANESHIRO, T. y BRODIE, A.F. *J. Biol. Chem.* 240 (1965), 895-902.
- 443) YONEYAMA, Y., SAWADA, H., TAKESHITA, M. y SUGITA, Y. *Lipids* 4 (1969), 321-326.
- 444) LADBROOKE, R.D., WILLIAMS, R.M. y CHAPMAN, D. *Biochim. Biophys. Acta* 150 (1968), 333-340.
- 445) FRY, J. y BRIDGES, J. *Progress Drug Metab.* 2 (1977), 71-115.
- 446) MOLDEUS, P. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 41 (1977), 29-39.
- 447) BALLEET, F., BOUMA, M.E., WANG, S.R., AMIT, N., MARAIS, J. y INFANTE, R. *Hepatology* 4 (1984), 849-854.



- 448) MORAIS, J.A. y WAGNER, J.G. *Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokinet.* 10 (1985), 295-307.
- 449) BERG, T., BUMAN, D y SEGLEN, P.O. *Exp. Cell. Res.* 72 (1972), 571-574.
- 450) GREEN, C.E., DABBS, J.E. y TYSON, C.A. *Anal. Biochem.* 129 (1983), 269-276.
- 451) BAUR, H., KASPEREK, S. y PFAFF, E. *Hoppe-Seyler'S Z. Physiol. Chem.* 356 (1975), 827-838.
- 452) GUZELIAN, P.S., BISSEL, D.M. y MEYER, U.A. *Gastroenterology* 72 (1977), 1232-1238.
- 453) EVARTS, R.P., MARSDEN, E. y THORGEIRSSON, S.S. *Biochem. Pharmacol.* 33 (1984), 565-569.
- 454) PAINE, A.J. y LEGG, R.F. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81 (1978), 672-679.
- 455) SIRICA, A.E. y PITOI, H.C. *Pharmacol. Rev.* 31 (1980), 205-221.
- 456) GIGER, U. y MEYER, U.A. *Biochem. Pharmacol.* 31 (1982), 1735-1741.
- 457) VICKERS, A.E.M. y BRENDDEL, K. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 26 (1983), 69-72.
- 458) DECAD, G.M., HSIEH, D.P.H. y BYARU, J.L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78 (1977), 279-284.
- 459) WADA, O., YANO, Y., URAIA, G. y NAKAO, K. *Biochem. Pharmacol.* 17 (1968) 595-603.
- 460) HOCKIN, L.J. y PAINE, A.J. *Biochem. J.* 210 (1983), 855-857.
- 461) TOMITA, Y., OHASHI, A. y KIKUCHI, G. *J. Exp. Med. (Tokyo)* 120 (1976), 239-250.
- 462) ASHMORE, J., RENOLD, A.E., NESBETT, F.B. y HASTINGS, A.B. *J. Biol. Chem.* 215 (1955), 153-161.
- 463) STRANGE, R.C. y PERCY ROBB, I.W. *Biochem. J.* 146 (1975), 509-512.
- 464) NOGUCHI, T., DIESTERHAFF, M. y GRANNER, D. *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2386-2390.
- 465) McKNIGHT, G., HAGER, L. y PALMIER, R. *Cell* 22 (1980), 469-477.
- 466) PILKIS, S.J., EXTON, J.H., JOHNSON, R.A. y PARK, C.R. *Biochim. Biophys. Acta* 343 (1974), 250-267.

- 467) ISRAELSSON, B. y TENGRUP, I. *Experientia* 36 (1980), 257-258.
- 468) BITAR, M. y WEINER, M. *Biochem. Pharmacol.* 32 (1983), 1921-1928.
- 469) BITAR, M. y WEINER, M. *Diabetes* 33 (1984), 37-44.
- 470) PASTAN, I. y PERLMAN, R. *Science* 169 (1970), 339-344.
- 471) PIFOT, H.C. y PERAINO, C. *J. Biol. Chem.* 238 (1963), 1910-1912.
- 472) STANDAERT, F.G., DREICHEN, K.L., SKIRBOLL, L.R. y MORGENROTH, V.H. *J. Pharm. Exp. Ther.* 199 (1976), 553-564.
- 473) SEAMON, K.B., PADGELL, W. y DALY, J.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 3363-3367.
- 474) BEAVO, J.A., ROGERS, N.L., CROFFORD, O.B., HARDMAN, J.G., SUTHERLAND, E.W. y NEUMAN, E.V. *Mol. Pharmacol.* 6 (1970), 597-603.
- 475) AMER, N.S. y KREIGBAUM, W.E. *J. Pharm. Sci.* 64 (1975), 1-37.
- 476) ROBISON, A.G., BUTCHER, R.W. y SUTHERLAND, E.W. in *Cyclic AMP* (1971), pp. 36-46 Academic Press N.Y.
- 477) FERENDELLI, J.A., JOHNSON, E.M., CHANG, M. y NEEDLEMAN, P. *Biochem. Pharmacol.* 22 (1973), 3133-3136.
- 478) HARRIS, D.M., SEMENAK, N.S. y HESS, S.M. *Ann. Rep. Med. Chem.* 8 (1973), 224-233.
- 479) KARIYA, T. y FIELD, J.B. *Biochim. Biophys. Acta* 451 (1976), 41-47.
- 480) TOMLINSON, S., McNEIL, S. y BROWN, B.L. *Clin. Endocrinol.* 23 (1985), 595-610.
- 481) CHRAPKIEWICZ, N.B., BEALE, E.G. y GRANNER, D.K. *J. Biol. Chem.* 257 (1982), 14428-14432.
- 482) MAURER, R. *Nature* 294 (1981), 94-97.
- 483) KUO, J. y GREENGARD, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64 (1969), 1349-1355.
- 484) SCHUMM, D. y WEBB, T. *J. Biol. Chem.* 253 (1978), 8513-8517.
- 485) HOO, T.T., LEYNSE, B., FETKAMP, T.E.W. y NEUMAN, H. *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.* 17 (1971), 199-201.
- 486) HARRIS, M.Y., MIELS, G.C. y LEVIN, W.C. *Arch. Int. Med.* 117 (1966), 425-430.