

Tesis de Posgrado

Estudio comparativo de las enzimas porfobilinogenasa y deaminasa en hígado de cerdo y eritrocitos humanos

Fumagalli, Silvia Ana

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fumagalli, Silvia Ana. (1988). Estudio comparativo de las enzimas porfobilinogenasa y deaminasa en hígado de cerdo y eritrocitos humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2174_Fumagalli.pdf

Cita tipo Chicago:

Fumagalli, Silvia Ana. "Estudio comparativo de las enzimas porfobilinogenasa y deaminasa en hígado de cerdo y eritrocitos humanos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2174_Fumagalli.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ENZIMAS PORFOBILINOGENASA Y DEAMINASA
EN HIGADO DE CERDO Y ERITROCITOS HUMANOS

por:

SILVIA ANA FUMAGALLI

DIRECTOR: Dra. María Victoria Rossetti

LUGAR DE TRABAJO: Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y
Porfirias (CIPYP). Departamento de Química Biológica. Facultad
de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
(CONICET)

Tesis presentada para optar al título de:

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1 9 8 8

2174
8/2.

a los míos

INDICE GENERAL

Página

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

OBJETIVOS

INTRODUCCION	1
- CAPITULO I: ESTRUCTURA TETRAPIRROLICA Y COMPUESTOS RELACIONADOS	1
I.1. Estructura y propiedades físicas	1
I.2. Porphirinas	3
I.3. Porphirinógenos	3
I.4. Metaloporphirinas	3
I.5. Tetrapirroles de cadena abierta	8
I.6. Distribución en la naturaleza	10
I.7. Referencias	12
- CAPITULO II: BIOSINTESIS DE PORFIRINAS	13
II.1. Generalidades	13
II.2. Enzimas involucradas	15
II.3. Referencias	32
- CAPITULO III: PORFOBILINOGENASA	39
III.1. Introducción	39
III.2. Propiedades generales	40
III.3. Estudios cinéticos	53
III.4. Mecanismo de acción de la PBG-asa	55
III.5. Estudios genéticos	84
III.6. Referencias	85
- CAPITULO IV: REGULACION Y PORFIRIAS	92
IV.1. Regulación	92

	Página
IV.2. Porfirias	101
IV.3. Referencias	109
 MATERIALES Y METODOS	 113
- CAPITULO I: MATERIALES	113
I.1. Fuente enzimática	113
I.2. Sustrato: Porfobilinógeno	113
I.3. Geles empleados	113
I.4. Reactivos utilizados	113
I.5. Equipos empleados	114
- CAPITULO II: METODOS	115
II.1. Separación de hemoglobina de eritrocitos	115
II.2. Sistema standard de incubación	115
II.3. Unidad enzimática	117
II.4. Determinación de la actividad enzimática	118
II.5. Determinación del contenido proteico	119
II.6. Determinación de las porfirinas formadas y del tipo isomérico de las mismas	121
II.7. Determinación del peso molecular	123
II.8. Técnicas para la inmovilización de enzimas	126
- CAPITULO III: REFERENCIAS	127
 RESULTADOS Y DISCUSION	 128
- CONSIDERACIONES GENERALES	128
- PARTE I: DEAMINASA Y PBG _{AS} DE HIGADO PORCINO	129
CAPITULO I: AISLAMIENTO Y PURIFICACION	129
I.1. Aislamiento y purificación de deaminasa	129
I.2. Aislamiento y purificación de la PBG _{AS}	133
I.3. Determinación de los pesos moleculares de la deaminasa y de la PBG _{AS} de hígado de cerdo	139
I.4. Estudio comparativo	139
CAPITULO II: PROPIEDADES Y ESTUDIOS CINETICOS	
II.1. Efecto de la atmósfera de incubación sobre la actividad enzimática	142

	Página
II.2. Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad	144
II.3. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática	144
II.4. Determinación del pH óptimo de la reacción	145
II.5. Estudios cinéticos	145
II.6. Estequiometría de la reacción	152
II.7. Estudio cinético comparativo	157
CAPITULO III: OTRAS PROPIEDADES	159
III.1. Efecto de protectores de grupos tioles y disulfuro	159
III.2. Efecto de inhibidores de grupos tioles y disulfuro	160
III.3. Efecto de iones amonio sobre la actividad enzimática	167
III.4. Acerca de la existencia de un factor regulador	167
- PARTE II: DEAMINASA Y PBG-asa DE ERITROCITOS HUMANOS	173
CAPITULO I: AISLAMIENTO Y PURIFICACION. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR	173
I.1. Purificación de la deaminasa	173
I.2. Purificación de la PBG-asa	180
I.3. Determinación de los pesos moleculares	185
CAPITULO II: PROPIEDADES Y ESTUDIOS CINETICOS	189
II.1. Propiedades de la deaminasa y PBG-asa	189
II.2. Estudios cinéticos	195
CAPITULO III: OTRAS PROPIEDADES QUE CARACTERIZAN A LA DEAMINASA DE GLOBULOS ROJOS HUMANOS	207
III.1. Efecto de los iones amonio y de la hidroxilamina	207
III.2. Efecto de cationes	211
III.3. Cinética en presencia de cationes mono y divalentes	215
III.4. Estructura cuaternaria de la deaminasa, Equilibrio de asociación-disociación	217

- PARTE III: REFERENCIAS

CONCLUSIONES

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar a María Victoria, porque con ella me inicié en el campo de la investigación como estudiante de Química Biológica II, por sus valiosas contribuciones durante la dirección de este Trabajo y especialmente por su constante estímulo y afecto.
 - A Alcira, quien con el aporte de sus conocimientos, su guía y apoyo permanente contribuyó a la realización de esta Tesis.
 - A Mónica, por su incansable espíritu de colaboración, por su constante apoyo moral y estímulo y por su amistad.
 - A Ana Adela y Mónica, por su valiosa colaboración e importantes aportes en la discusión de resultados.
 - A Ana María Buzaleh, por la excelente transcripción de los manuscritos y por su especial comprensión y compañerismo.
- A la Sra. Beatriz Ricillo de Aprea y a la Srta. Hilda Gasparoli por la eficiente asistencia técnica.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por las becas otorgadas.
 - Al CONICET, SUBCYT y Banco de la Nación Argentina, por los subsidios otorgados a la Dra. Alcira Batlle, con los cuales se ha financiado este Trabajo.
 - A mis compañeros del CIPYP, por los momentos compartidos y muy especialmente a Susana por su constante apoyo y amistad.

ABREVIATURAS

AIA	Iodoacetamida
ALA	Acido δ -aminolevúlico
ALA-D	Acido δ -aminolevúlico dehidrasa
ALA \leftarrow S	Acido δ -aminolevúlico sintetasa
BAL	British Anti-Lewisik o dimercapto propanol
Copro	Coproporfirina
Coprogen	Coproporfirinógeno
CPG-asa	Coprogenasa
DDC	3,5-dicarbetoxi-1,4-dihidrocolidina
DOVA	γ - δ -dioxovalerato
DOVA-T	γ - δ -dioxovalerato transaminasa
DTE	Ditioeritrol
DTNB	Acido 5-5'ditiobis(2-nitrobenzoico)
GSH	Glutati6n reducido
Hb	Hemoglobina
HCB	Hexaclorobenceno
HMB	Hidroximetilbilano
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
IA	Iodoacetamida
NEMI	N-etil-maleimida
PAI	Porfiria aguda intermitente
PBG	Porfobilinógeno
PBG-asa	Porfobilinogenasa
PCMB	p-Cloromercuribenzoato
PM/PM's	Peso molecular/pesos moleculares
Proto	Protoporfirina
Protogen	Protoporfirinógeno
PTG-asa	Protoporfirinógeno oxidasa
SMZ	Sulfamerazina
Suc.CoA	Succinil coenzima A
Suc.CoA-S	Succinil coenzima A sintetasa
TCA	Acido tricloroacético
Tris	Tri(Hidroximetil)amino metano
URO	Uroporfirina
Urogen	Uroporfirinógeno

OBJETIVOS

Las porfirinas en general participan en un número de reacciones metabólicas de gran significado fisiológico, tales como transporte de electrones, energía y gases; oxidaciones biológicas; fijación de nitrógeno; etc.

Fundamentalmente, en los organismos fotosintéticos el camino de las porfirinas deriva hacia las clorofilas y bacterio-clorofilas y en el resto de los seres vivos hacia el hemo; si bien debe tenerse presente que en algunas bacterias la bifurcación hacia la vía de las corrinas es también de importancia.

La conversión enzimática del monopirrol porfobilinógeno en el tetrapirrol uroporfirinógeno, por acción de la porfobilinogenasa es la tercer etapa del camino biosintético del hemo y clorofilas.

La porfobilinogenasa es una proteína híbrida constituida por dos enzimas: la deaminasa o hidroximetilbilano sintetasa y la isomerasa o uroporfirinógeno III cosintetasa. En ausencia de isomerasa, la deaminasa une cuatro moléculas de porfobilinógeno dando lugar a la formación de uroporfirinógeno I; mientras que cuando el complejo PBG-asa está "armado", el producto final de la condensación es el isómero III del uroporfirinógeno, el cual es el verdadero intermediario fisiológico.

En condiciones normales, la biosíntesis del hemo se lleva a cabo con un alto grado de eficiencia, debido a la existencia de una serie de mecanismos de regulación finamente coordinados. Si alguno de estos controles falla, como ocurre en las porfirias, se produce la acumulación y excreción de distintos intermediarios de esta síntesis, con graves consecuencias para el organismo. Un ejemplo de esta situación la encontramos en la llamada porfiria aguda intermitente, en la cual el defecto enzimático se halla a nivel de la deaminasa.

Se sabe que en los hepatocitos la velocidad de síntesis del hemo está regulada primariamente por la ácido δ -aminolevúlico sintetasa, enzima que cataliza la etapa inicial del camino biosintético. Asimismo, existen algunas evidencias que señalan a la deaminasa como enzima clave en el control del flujo metabólico en células eritropoyéticas desarrolladas.

En base a estas consideraciones, nos pareció de interés estudiar la porfobilinogenasa y su componente deaminasa en dos fuentes pertenecientes a organismos superiores pero de diferente origen tisular. Con este fin se purificaron y caracterizaron estas enzimas partiendo de un tejido no eritropoyético, como lo es el hígado porcino y de otro eritropoyético, tal como los eritrocitos humanos. De esta manera, no sólo se pudieron analizar e interpretar las semejanzas y diferencias existentes entre ambas enzimas de una misma fuente, sino también investigar el posible rol regulatorio que parece poseer la deaminasa en los tejidos eritropoyéticos desarrollados.

INTRODUCCION

CAPITULO I

ESTRUCTURA TETRAPIRROLICA Y COMPUESTOS RELACIONADOS

	Página
I.1. Estructura y propiedades físicas	1
I.2. Porfirinas	3
I.3. Porfirinógenos	3
I.4. Metaloporfirinas	3
I.5. Tetrapirroles de cadena abierta	8
I.6. Distribución en la naturaleza	10
I.7. Referencias	12

I. ESTRUCTURA TETRAPIRROLICA Y COMPUESTOS RELACIONADOS

La estructura tetrapirrólica de las porfirinas es una de las bases primordiales para la supervivencia en la mayoría de los sistemas biológicos. Su importancia vital se manifiesta en la diversidad de funciones en la que está involucrada constituyendo por ejemplo, el grupo prostético de una gran variedad de hemoproteínas, tales como hemoglobina, mioglobina, citocromos, peroxidases, catalasas, etc., así como también la estructura básica fundamental para la síntesis de corrinas, vitamina B₁₂, clorofilas y bacterioclorofilas.

I.1. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICAS

Los tetrapirroles, naturales o sintéticos, derivan de dos núcleos básicos: porfina y clorina (Figura I.1.), que contienen cuatro anillos pirrólicos (A, B, C, D) unidos entre sí por cuatro puentes metenos (γ , β , γ , δ); los carbonos externos β , β' de los anillos se numeran de 1 a 8 comenzando por el núcleo A. Como se puede apreciar la única diferencia que existe entre ambas estructuras es la presencia del anillo D totalmente reducido en la clorina.

La existencia de un sistema de dobles ligaduras alternadas da como resultado una estructura resonante, muy estable y planar, que además le confiere a la molécula ciertas propiedades físicas características que son utilizadas habitualmente para su detección, aislamiento, identificación y cuantificación. Entre ellas podemos mencionar:

- a) Solubilidad: Se extraen con solventes orgánicos, generalmente éter y dioxano.
- b) Espectros de absorción: Poseen bandas fuertes y características en las regiones visible y U.V. cercano. El espectro de absorción de los derivados tetrapirrólicos exhibe un máximo de absorción en la región entre los 350 y 450 nm, conocido como "banda de Soret" y empleado generalmente para la cuantificación de estos pigmentos. El número y patrón de bandas que se puede observar en la zona del visible varía con el tipo de

tetrapirról, con el solvente y con el pH, pero es absolutamente característico para cada uno de ellos, en un solvente y pH dados.

- c) **Fluorescencia:** Los compuestos derivados de los tetrapirroles, conocidos como porfirinas, en su estado libre o como ésteres presentan una intensa fluorescencia roja emitida por radiación con luz U.V. de longitud de onda de aproximadamente 400 nm. Esta propiedad permite detectar concentraciones del orden de 10^{-8} M; de allí que este método sea actualmente el más utilizado en la cuantificación de estas estructuras.

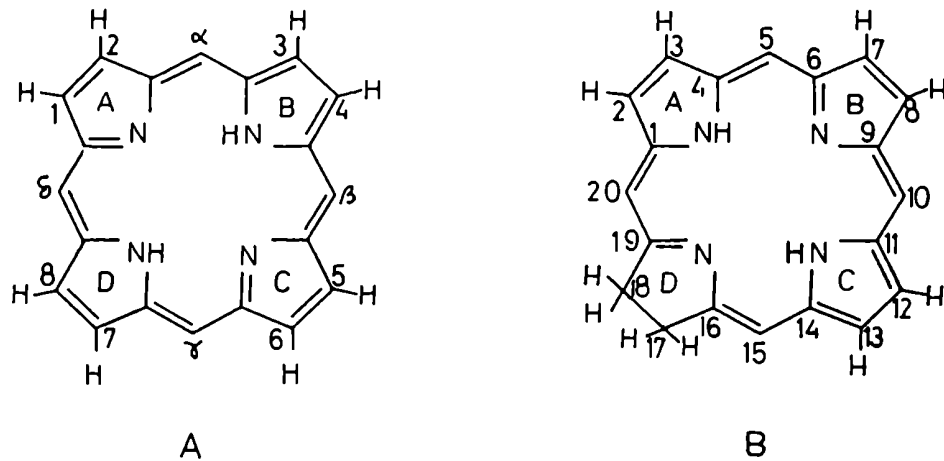


FIGURA I.1.: Estructura de la porfina (A) y de la clorina (B).
Nomenclatura del núcleo según Fisher (A) e IUPAC (B)

Como ya mencionáramos, los tetrapirroles encontrados en la naturaleza no son más que modificaciones de dos esqueletos básicos (Figura I.1.), entre los cuales encontramos:

- Sustitución parcial o total de los hidrógenos de los átomos de carbono externos por restos alquilo.
- Sustitución o reemplazo sobre los puentes meténicos. Los sustituyentes pueden ser átomos de hidrógeno, como aparecen en los porfirinógenos; un anillo de ciclopentanona como en las clorofilas; o un reemplazo como ocurre en el anillo porfirínico de la corrina, en el cual se ha perdido el puente

meténico δ .

c) Inserción de un metal y formación de las metaloporfirinas.

I.2. PORFIRINAS

Las porfirinas son derivados tetrapirrólicos que no han incorporado ningún átomo metálico; se diferencian entre sí según la naturaleza y ordenamiento de las cadenas laterales que sustituyen las posiciones 1 a 8 de los anillos pirrólicos. En la Figura I.2. vemos la estructura básica de las porfirinas de interés biológico.

Existen cuatro isómeros posibles para uroporfirina (Uro) y coproporfirina (Copro) (Figura I.3.), ya que en estas porfirinas hay dos grupos de sustituyentes distintos: acético y propiónico en la Uro y metilo y propiónico en la Copro. En la naturaleza sólo se han encontrado los isómeros del tipo I y III.

En el caso de la protoporfirina (Proto), que tiene tres sustituyentes diferentes (metilo, vinilo y propiónico) pueden existir 15 isómeros de posición. En la naturaleza sólo se ha encontrado el que lleva arbitrariamente el número IX (Figura I.2.).

Es muy importante resaltar que sólo los tetrapirroles de la serie III cumplen una función fisiológica activa, mientras que los de la serie I son solamente productos anormales del camino metabólico de las porfirinas.

I.3. PORFIRINOGENOS

Los porfirinógenos son las estructuras totalmente reducidas de las porfirinas (Figura I.4.). Son compuestos incoloros que se oxidan espontáneamente a las correspondientes porfirinas y son los verdaderos intermediarios en la biosíntesis normal del hemo y clorofilas.

I.4. METALOPORFIRINAS

Las porfirinas libres o esterificadas se combinan fácilmente con metales para formar quelatos.

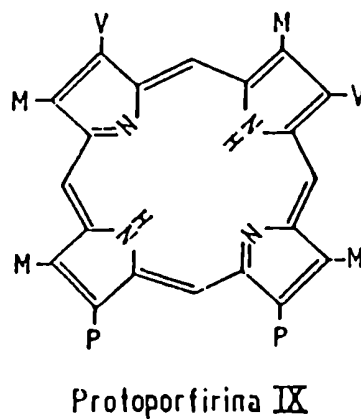
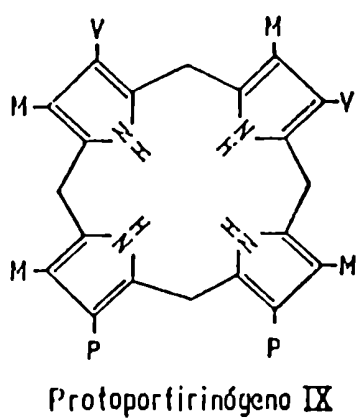
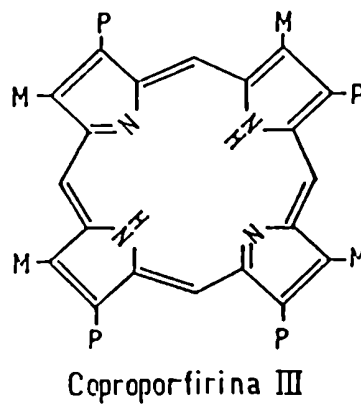
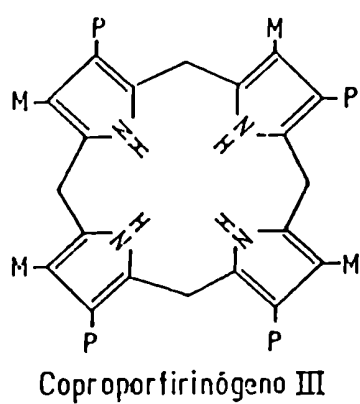
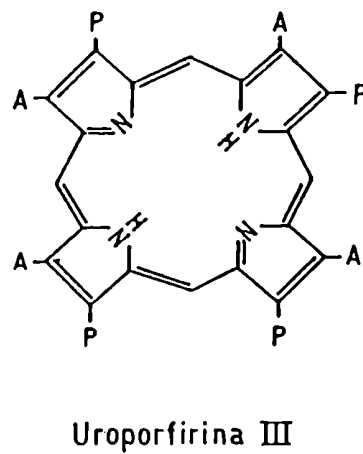
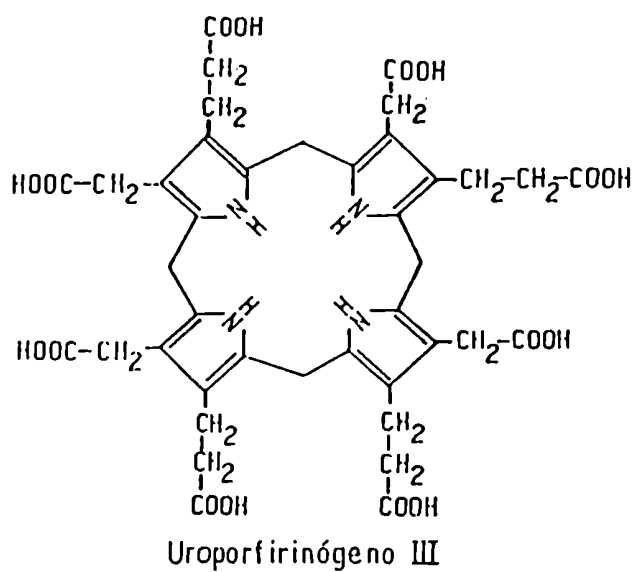


FIGURA I.2.: Estructuras de las porfirinas de interés biológico

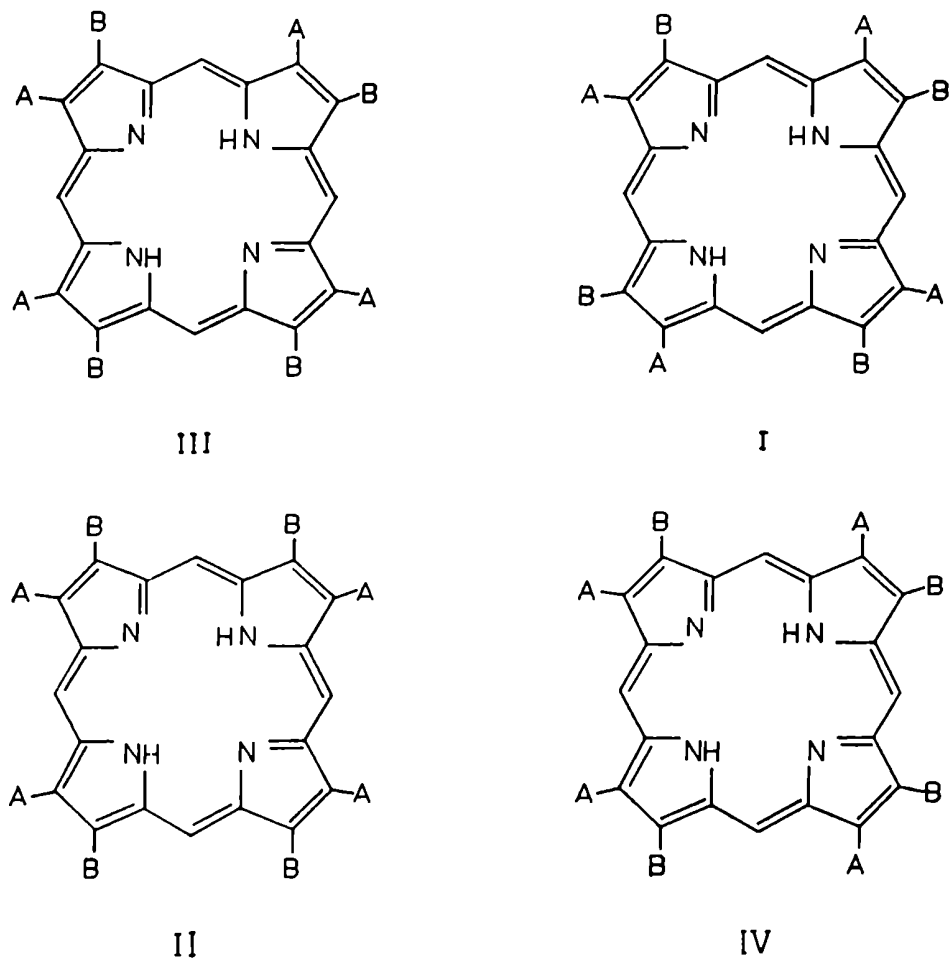


FIGURA I.3.: Estructuras de los isómeros de las uro y coproporfirinas

Los tetrapirroles quelados de importancia biológica son: "hemo" (Figura I.5.), quelato del hierro con proto IX; "clorofila", "bacterioclorofila" (Figura I.6.), quelatos de magnesio con proto IX y "corrinas" (Figura I.7.), quelatos de cobalto con derivados del uroporfirinógeno III. El hemo o ferro-protoporfirina IX, es la forma bajo la cual existen las hemoproteínas en las células. El hemo se oxida fácilmente en contacto con el aire a hematina o hemina según haya presentes iones hidroxilos o cloruros. El cloro-derivado es muy estable y se lo emplea para aislar el grupo prostético de la hemoglobina (Figura I.5.).

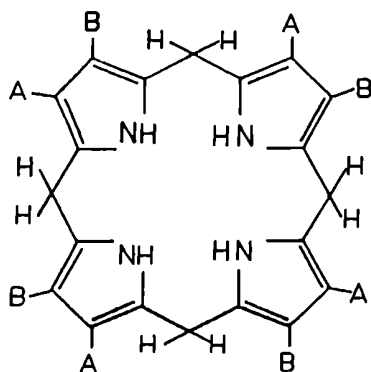
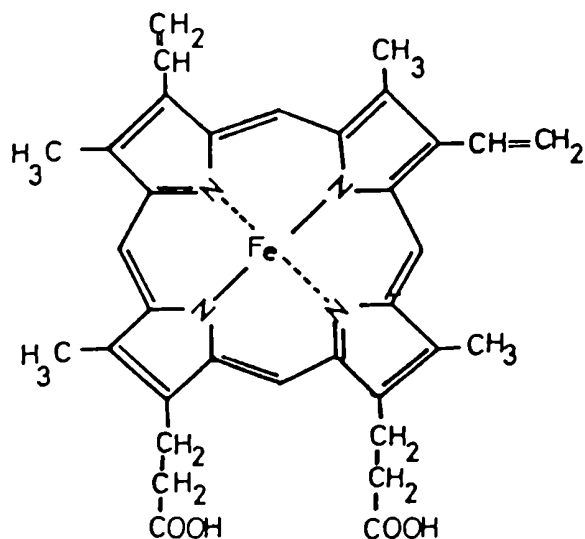


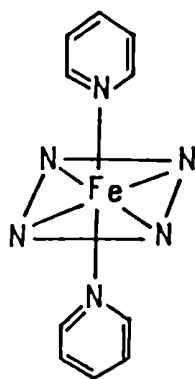
FIGURA I.4.: Estructura de un porfirinógeno

El hemo posee una estructura en la cual los cuatro anillos pirrólicos y el hierro están ubicados en un plano, conservando el metal su capacidad de unión coordinativa con dos moléculas que se sitúan por arriba y por debajo del plano que contiene el anillo porfirínico. Estos derivados se conocen como "hemocromos" o "hemocromógenos" (Figura I.5.). La hematina también da lugar a compuestos similares, conocidos como hemicromos o hemicromógenos.

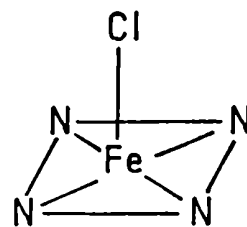
Las clorofilas son tetrapirroles derivados de la clorina con un anillo adicional (E) de ciclopentanona, formado por ciclización de la cadena lateral propiónica sobre el carbono 6 con el carbono del puente meténico. El anillo D (en las clorofilas de las plantas) y los B y D (en las clorofilas de las bacterias) se encuentran reducidos. Además, la cadena lateral propiónica sobre el carbono 7 del anillo D está esterificada con un alcohol isoprenoide de cadena larga que generalmente es el fitol (Figura I.6). En la naturaleza existen diferentes tipos de clorofilas, siendo las más comunes las clorofilas a y b y la bacterioclorofila. *In vivo*, todas las clorofilas están unidas a complejos lipoproteicos, aunque aún no se conoce exactamente cuál es la naturaleza de su enlace.



HEMO



PIRIDINA-HEMOCROMO



CLOROHEMINA

FIGURA I.5.: Estructura y nomenclatura de los complejos de hierro de la protoporfirina.

En el grupo de las corrinas encontramos la vitamina B₁₂ (Figura I.7.); su diferencia con el grupo básico de la porfina reside en que tiene un puente metileno menos entre los pirroles, de modo que dos de ellos se encuentran unidos directamente a una de las cadenas laterales del pirrol y un grupo 5,6-dimetilbenzimidazol, que está coordinado a la quinta posición del cobalto

central; las cadenas laterales tienen grupos amida en vez de grupos ácido. Cuando se aísla la vitamina B₁₂ a partir del medio de fermentación, generalmente se obtiene con cianuro complejo a la sexta posición del cobalto. Este es el derivado comúnmente conocido como vitamina B₁₂, también denominado cianocobalamina o cianocobamina. Una de las formas coenzimáticas activas de la vitamina B₁₂ contiene el grupo 5'-deoxiadenosilo coordinado a la sexta posición del cobalto, en lugar del cianuro, siendo esta coenzima la 5'-deoxiadenosilcobamida.

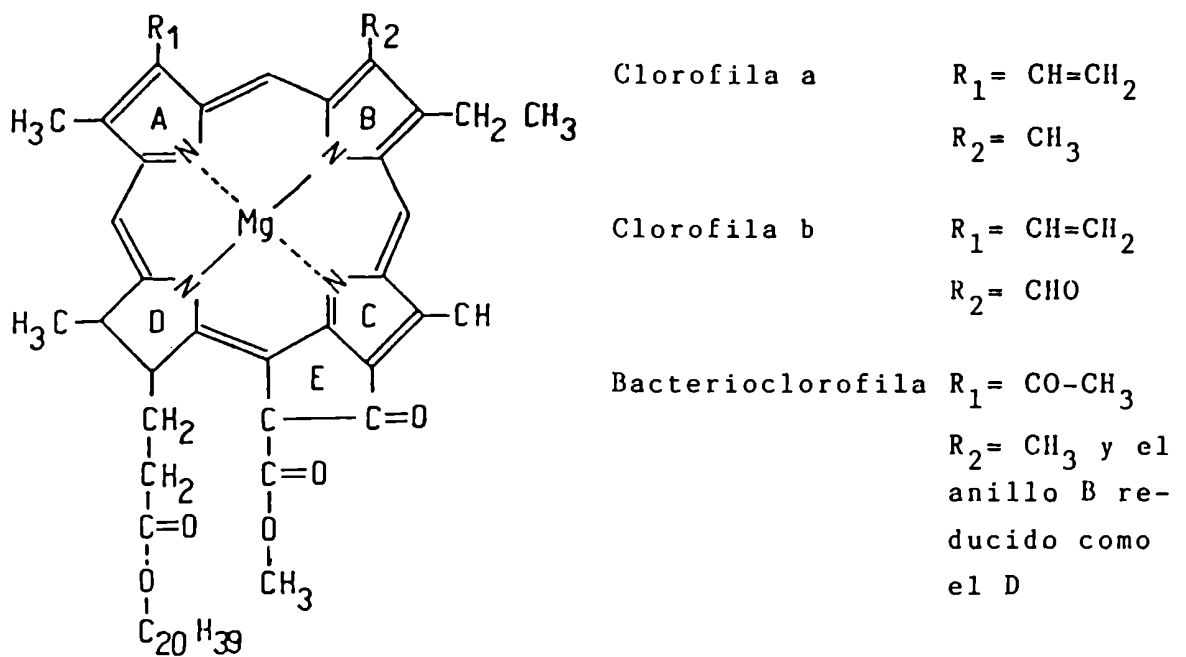


FIGURA I.6.: Estructura de las clorofilas a, b y bacterioclorofila.

I.5. TETRAPIRROLES DE CADENA ABIERTA

El proceso degradativo de la hemoglobina da como resultado tetrapirroles de cadena abierta, conocidos como pigmentos biliares. Estos compuestos también se hayan presentes en los grupos prostéticos de las ficobilinas de las algas rojas y azul-verdosas (Figura I.8.).

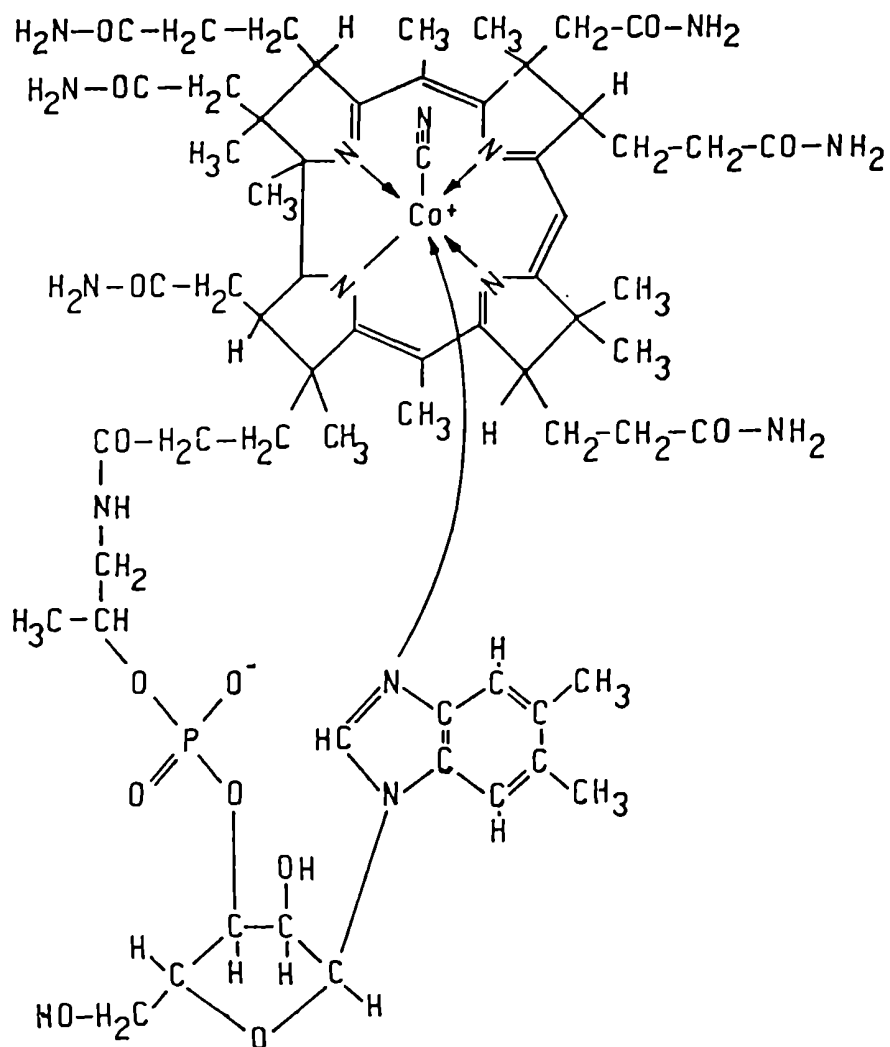


FIGURA I.7.: Estructura de la corrina. Cianocobalamin.

En el caso de los pigmentos biliares, el primer paso en la degradación del hemo es la oxidación del carbono del puente meténico α por acción de una α -metenil oxidasa, con liberación de monóxido de carbono. El producto de esta oxidación se convierte rápidamente en el tetrapirrol de cadena abierta, conocido como biliverdina IX, que luego sufre una reducción enzimática a bilirrubina IX (Figura I.8.A). Sabemos que la bilirrubina es transportada al hígado donde se convierte en un diglucurónido soluble en agua, de manera que luego se excreta en el duodeno por la bilis.

Las ficobilinas de las algas rojas y azul-verdosas son en realidad cromoproteínas solubles en agua que poseen pigmentos biliares como grupos prostéticos. Hay dos tipos de ficobilinas, la ficocianina (azul) y la ficoeritrina (roja), para las cuales se han sugerido las estructuras que se ilustran en la Figura I.8.B.

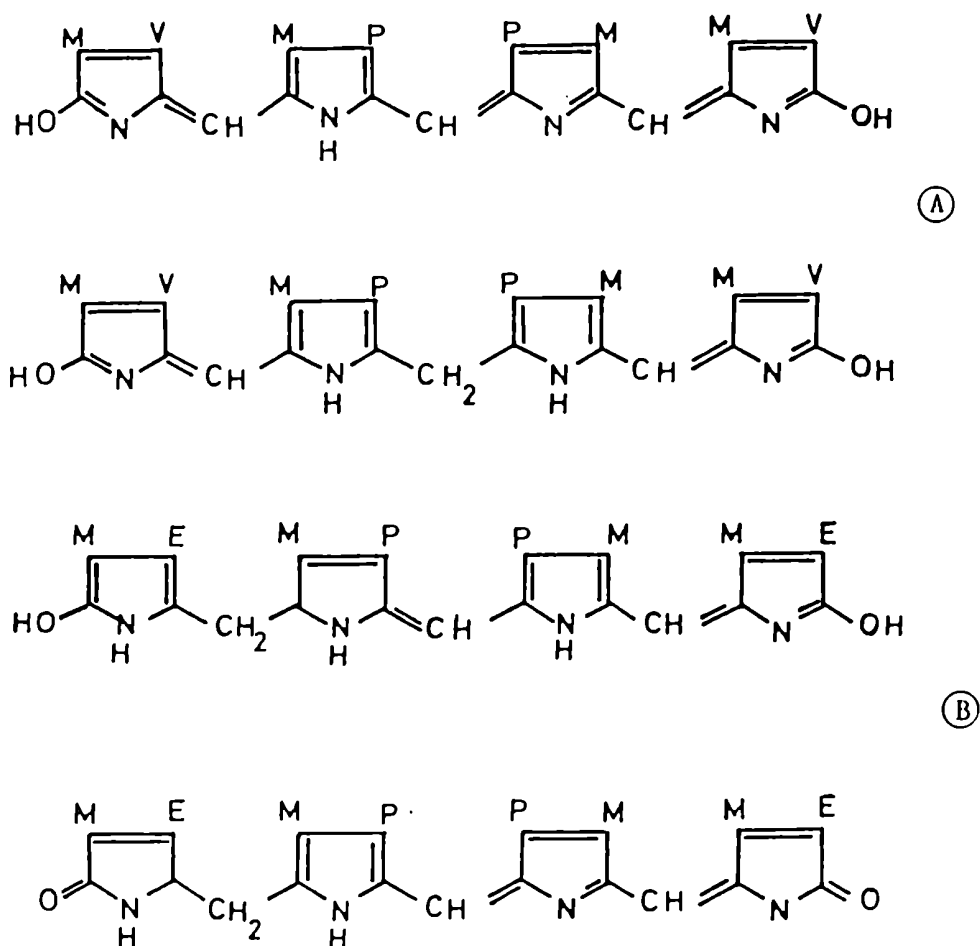


FIGURA I.8.: Estructura de tetrapirroles de cadena abierta.
Estructuras probables de la biliverdina IX y bilirrubina IX (A) y de la ficocianobilina y ficoeritrobilina (B).

I.6. DISTRIBUCION EN LA NATURALEZA

Las porfirinas libres existen en la naturaleza en pequeñas cantidades y sólo se han encontrado en materiales biológicos los isómeros I y III de porfirinas llevando entre 8 y 3

carboxilos y la proto IX (Falk, 1964). Existe una concentración relativamente elevada de Proto y Copro libres en los nódulos de raíces de leguminosas, encontrándose como trazas en algunas plantas superiores (Klüver, 1948; Falk y col., 1959).

En la glándula de Harder de la rata se acumula proto IX así como también en las áreas pigmentadas de las cáscaras de huevo de muchas especies de pájaros (Schwartz y col., 1975), mientras que en las conchas de ciertos moluscos se ha encontrado Uro (Nicholas y Confort, 1949; Fox y Vevers, 1960).

Las porfirinas y especialmente la Copro se excretan al medio de crecimiento de una gran cantidad de microorganismos (Lascelles, 1964).

En cuanto a las metaloporfirinas, existen complejos de Uro III con cobre en las plumas de *Turacus indicus* en una concentración elevada (Nicholas y Rimington, 1954). También hay algunas evidencias de la presencia de magnesio-porfirinas en sangre (Borg y Cotzias, 1958).

Las hierro-porfirinas no existen libres en los tejidos en condiciones normales mientras que en los casos patológicos la hemina se deposita en los tejidos como resultado de filtraciones de sangre a través de capilares. La hemina se encuentra asimismo, como producto metabólico en ciertos organismos inferiores (Fox y Vevers, 1960).

Los productos de degradación de la clorofila, tales como feofitinas y feoforbidas generalmente complejados con níquel o vanadio están presentes en aceites de esquistos y en petróleo crudo, como así también en arenas bituminosas y en materiales asfálticos (Treibs, 1934; Vallentyne, 1960).

Si bien las porfirinas libres no tienen una función fisiológica claramente definida, no debemos olvidar que son compuestos intermedios en la biosíntesis de hemo y clorofila. Recordemos además, que esta última es fundamental en el proceso de fotosíntesis; así como el hemo es el grupo prostético de numerosas hemoproteínas vitales, entre las cuales encontramos la hemoglobina transportadora de gases en la sangre; los citocromos a_1 , a_3 , b, c y c_3 de la cadena respiratoria, el citocromo P-450 mitocondrial y ciertas enzimas como la catalasa y la peroxidasa (Batlle y col., 1981).

I.7. REFERENCIAS

- Batlle, A.; Magnin, P. & Wider, E. (1981) en "Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento" Ed. EUDEBA.
- Borg, D. & Cotzias, G. (1958) Nature 182, 1677.
- Falk, J. (1964) en "Porphyrins and Metalloporphyrins", vol.2. BBA Library. Elsevier Publ. Co. Amsterdam, London, New York.
- Falk, J.; Appleby, C. & Porra, R. (1959) Symp. Soc. Explt. Biol. 13, 73.
- Fox, H. & Vevers, G. (1960) en "The Nature of Animal Colours", (Eds. Sidwick y Jackson). London.
- Klüver, H. (1948) J. Psychol. 25, 331.
- Lascelles, J. (1964) en "Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation" (Ed. Benjamin), New York.
- Nicholas, R. & Confort, A. (1949) Biochem. J. 45, 208.
- Nicholas, R. & Rimington, C. (1954) Biochem. J. 50, 194.
- Schwartz, S.; Stephenson, B.; Sarkar, E. & Bracho, M. (1975) Am. N. Y. Acad. Sci. 244, 570.
- Treibs, A. (1934) Angew Chemin 47, 725.
- Vallentyne, J. (1960) en "Comparative Biochemistry of Photo-reactive Systems", vol.1, pp.83. Symp. Quant. Biol. (Ed. M.B. Allen), Academic Press, New York.

CAPITULO II

BIOSINTESIS DE PORFIRINAS

	Página
II.1. Generalidades	13
II.2. Enzimas involucradas	15
II.2.1. Succinil CoA Sintetasa	15
II.2.2. Acido δ -aminolevúlico sintetasa	16
II.2.3. γ - δ -Dioxovalerato transaminasa	19
II.2.4. Acido δ -aminolevúlico dehidrasa	20
II.2.5. Porfobilinogenasa	22
II.2.6. Uroporfirinógeno decarboxilasa	22
II.2.7. Coproporfirinogenasa	26
II.2.8. Protoporfirinógeno IX oxidasa	29
II.2.9. Ferroquelatasa	30
II.3. Referencias	32

II. BIOSINTESIS DE PORFIRINAS

II.1. GENERALIDADES

Todas las formas vivientes, excepto los virus y unas pocas bacterias procariotas, son capaces de sintetizar sus porfirinas a través de un camino cuyas etapas son comunes hasta la formación de Proto IX; posteriormente se producen las ramificaciones específicas hacia hemos, clorofilas y bacterioclorofilas en animales, plantas y bacterias, dependiendo de las necesidades del organismo.

En la Figura II.1. se muestra el camino biosintético de las porfirinas, indicando además las enzimas involucradas en cada etapa.

El ácido δ -aminolevúlico sintetasa (ALA-S) es la primera enzima específica del camino, que sintetiza ácido δ -aminolevúlico (ALA) a partir de dos moléculas simples, succinato y glicocola. Por acción de la δ -aminolevúlico dehidrasa (ALA-D), dos moléculas de ALA dan lugar al intermediario aromático y único pirrol natural, el porfobilinógeno (PBG). El complejo enzimático de la porfobilinogenasa (PBG-asa) constituido por deaminasa e isomerasa, sintetiza a partir de cuatro moléculas de PBG el primer anillo tetrapirrólico, uroporfirinógeno III (Urogen III), con 8 carboxilos en las cadenas laterales; en ausencia de isomerasa se obtiene uroporfirinógeno I (Urogen I). De allí en adelante, la uroporfirinógeno decarboxilasa decarboxila la porfirina octacarboxílica para dar intermediarios con 7, 6 y 5 carboxilos, llegando finalmente al coproporfirinógeno (Coprogen) III (ó I) con 4 carboxilos. Este, en dos etapas posteriores catalizadas por las enzimas coprogenasa y protogen oxidasa, se transforma en Proto IX, que por último, mediante una metal quelatasa que inserta el metal (hierro o magnesio) se convierte en hemo y clorofila respectivamente.

En el caso de las corrinas la ramificación se produce a la altura de Urogen III.

Es de hacer notar que las enzimas que catalizan la formación de ALA y las tres últimas etapas, están localizadas en la mitocondria, mientras que las restantes se encuentran en el citoplasma (Granick y Mauzerall, 1958 a).

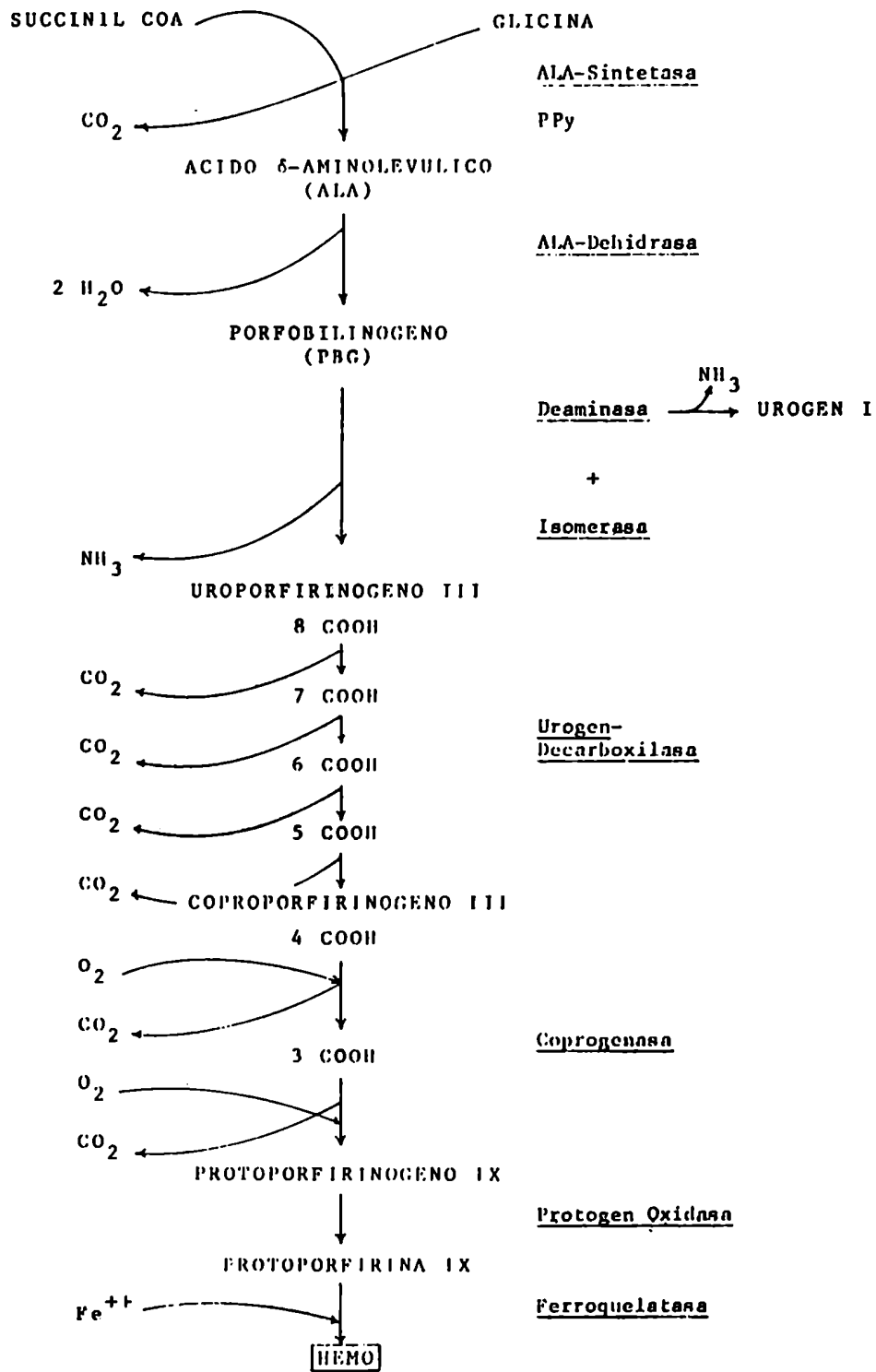


FIGURA II.1.: Camino biosintético de las porfirinas con las enzimas involucradas en cada etapa

II.2. ENZIMAS INVOLUCRADAS

II.2.1. Succinil CoA Sintetasa

Numerosas evidencias indican que la succinil CoA sintetasa (Succ.CoA-S) desempeña un importante papel en la biosíntesis de los tetrapirroles y en su control (Wider de Xifra y Tigier, 1971; Batlle y col., 1975).

Esta enzima, conocida también como succinil CoA tioquinasa, cataliza reversiblemente la formación de succinil CoA a partir de succinato, CoA y ATP (Figura II.2.).

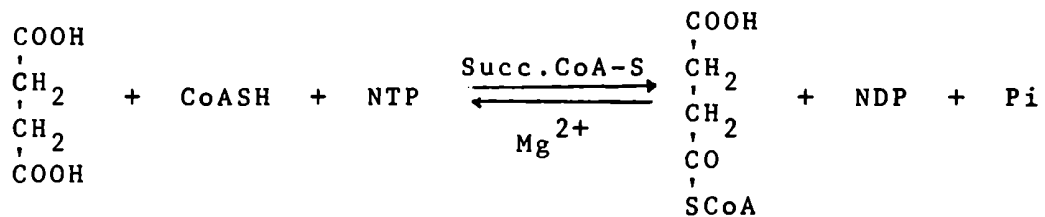


FIGURA II.2.: Síntesis de succinil CoA catalizada por la succinil CoA sintetasa

La Succ.CoA-S fue descubierta por Kaufman en 1951 y desde entonces ha sido detectada, aislada y purificada a partir de numerosas fuentes tales como: corazón de cerdo, riñón, hojas de espinaca, leguminosas, trigo, tabaco, mitocondrias de alcaucil, callos de soya y *E. coli* (Nishimura y Grinnel, 1972; Wider de Xifra y Batlle, 1973).

La enzima proveniente de la mayoría de los tejidos estudiados, resultó ser particulada, presentando una alta especificidad para el succinato y la CoA pero no así para el nucleósido trifosfato, el cual varía con la fuente estudiada. Requiere además, un metal divalente, magnesio o manganeso, para manifestar al máximo su actividad (Wider de Xifra y Batlle, 1980).

La Succ.CoA-S es una enzima sulfhidrónica, que se inhibe por reactivos típicos de grupos tioles, tales como iodoacetamida (IA) y p-cloromercuribenzoato (PCMB). En algunos tejidos necesita la presencia de un protector de grupos sulfhidrilos, como el glutatión reducido (GSH), para mantenerse activa (Wider y Tigier, 1970; Wider de Xifra y Batlle, 1974).

El peso molecular varía entre 70.000 y 140.000, dependiendo de la fuente proteica en estudio. Mediante el empleo de agentes disociantes se ha demostrado que está formada por dos tipos de subunidades, α y β , de pesos moleculares 29.000 y 41.000 respectivamente. Así, en *E. coli* la enzima se presenta en su forma más estable como tetrámero del tipo $\alpha_2\beta_2$ (Batlle y col., 1981).

En cuanto al mecanismo de acción, es de hacer notar que si bien numerosas evidencias experimentales demostraron con certeza que la primer etapa es la fosforilación de la enzima por el nucleósido trifosfato rico en energía, los pasos siguientes no se encuentran aún totalmente esclarecidos, de allí que en la Figura II.3. se planteen caminos alternativos, o aún, no enzimáticos, además de otros mecanismos estudiados (Wider de Xifra y Batlle, 1976).

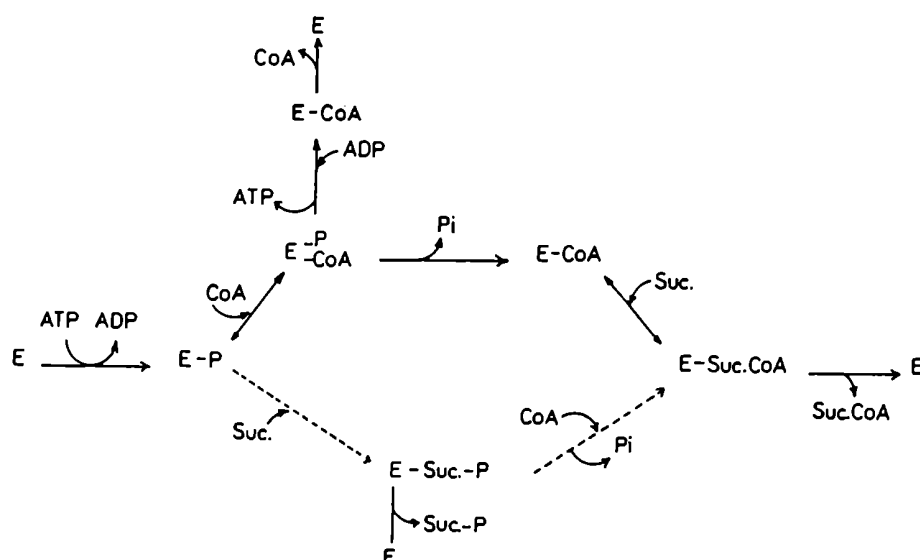


FIGURA II.3.: Mecanismo de acción de la Succ.CoA-S

II.2.2. Acido δ -aminolevúlico sintetasa

La formación de ALA a partir de glicocola y succinil CoA, es la primer etapa que conduce específicamente a la biosíntesis de porfirinas, catalizada en la mitocondria por la enzima ALA-S.

Esta enzima es sulfhidrúlica y altamente específica para la succinil CoA; requiere además, fosfato de piridoxal y CoA como cofactores y la deficiencia de vitamina B₆ produce una disminución en su actividad enzimática (Aoki y col., 1975).

Si bien normalmente la actividad de ALA-S se asocia a la fracción mitocondrial, es detectable también, bajo ciertas condiciones experimentales en el citoplasma. Así por ejemplo, en hígado de rata y embrión de pollo tratados con alilisopropilacetamida (AIA) y 3,5-dicarbetoxi-1,4-dihidrocolidina (DDC), potentes drogas porfirinogénicas, se encontró un considerable aumento de actividad del ALA-S citoplasmática (Hayashi y col., 1969; Ohashi y Kikuchi, 1972; Whiting y Elliot, 1972; Patton y Beattie, 1973). Muchos investigadores hallaron fuertes evidencias experimentales que indicaban que esta enzima se sintetiza en los polirribosomas citoplasmáticos, y así el ALA-S soluble no sería más que la proteína en tránsito a la mitocondria (Hayashi y col., 1969; Granick y Sassa, 1971; Whiting y Elliot, 1972).

En la mayoría de las fuentes empleadas, el ALA-S se caracteriza por su gran inestabilidad y corta vida media: 34 minutos en hígado de feto de ratas (Woods, 1974), 70 minutos en hígado de ratas adultas (Tschudy y col., 1965; Marver y col., 1966) y 160 minutos en cultivo de tejido de embrión de pollo (Sassa y Granick, 1970); lo cual dificulta su estudio y purificación. Teniendo en cuenta su carácter particulado y su gran labilidad una vez extraída de la célula, en 1978 Wider de Xifra y col. postularon que dentro de la célula el ALA-S se encontraría asociada a mitocondrias, lo cual le proporcionaría a la enzima una estructura natural más estable. Esta hipótesis ha encontrado apoyo experimental, ya que al brindarle a la enzima un soporte sólido que reconstituye artificialmente su ensamblamiento enzima-partícula, retiene su actividad por largo tiempo.

El peso molecular varía con la fuente proteica y con las condiciones de experimentación, así se han obtenido valores entre 47.000 y 200.000 para la fracción mitocondrial (Whiting y Elliot, 1972; Aoki y col., 1974; Woods y Murthy, 1975; Whiting y Granick, 1976; Paterniti y Beattie, 1979).

Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se detectó una única especie molecular mitocondrial de peso molecular 51.000 y tres especies citoplasmáticas de pesos moleculares 120.000, 79.000 y 51.000 (Oashi y Kikuchi, 1979). Estos mismos

autores demostraron que la proteína catalíticamente activa es un dímero con subunidades aparentemente idénticas, de PM 51.000, ya que las proteínas citoplasmáticas de pesos mayores no poseen actividad enzimática. De lo anteriormente expuesto surge que el ALA-S citoplasmática sería un complejo proteico compuesto por una subunidad catalíticamente activa de PM 51.000 y dos proteínas catalíticamente inactivas de PM's 79.000 y 120.000.

En cuanto al mecanismo de acción del ALA-S, se propuso que la glicocola se condensa con el fosfato de piridoxal, que es el cofactor de la enzima, formando un carbanión estable que luego reacciona con el carboxilo electrofílico de la succinil CoA para producir un intermediario muy inestable, el ácido α -amino- β -ceto adípico que unido a la enzima se decarboxila espontáneamente a ALA. Hace unos años, Nandi (1978 a) comprobó, por medio de estudios espectrales, la formación de una base de Schiff entre la proteína y el fosfato de piridoxal. Sus resultados también arrojaron fuertes evidencias a favor de la hipótesis de que un grupo crítico ϵ -aminolisil estaría involucrado en la formación de la base de Schiff entre la enzima y su cofactor. A continuación ocurriría una reacción de transaminación entre el complejo enzima-fosfato de piridoxal y la glicina (Nandi, 1978 b) que origina un complejo de estructura quinoide (Figura II.4.), sugiriendo que la formación del carbanión se debe a la pérdida de un átomo de hidrógeno de la glicina. La decarboxilación enzimática del grupo glicilcarboxilo después de la reacción de condensación de la unidad succinil forma el ácido α -amino- β -ceto adípico, un intermediario lógico en la formación de ALA (Nandi, 1978 b).

El paso de decarboxilación ocurre con retención de la configuración, mientras que el ataque inicial sobre la succinil CoA se efectúa sobre el lado opuesto (liberación del protón H_R de la glicina) (Figura II.4.). Esto se debe posiblemente a la naturaleza electrofílica del carbono del grupo carbonilo de la succinil CoA.

La actividad del ALA-S, generalmente la más baja comparada con la de las demás enzimas del camino del hemo, puede incrementarse marcadamente luego del tratamiento con diversas drogas; es por ello que se le asigna a esta enzima un rol regulatorio esencial en este camino biosintético (Granick y Sassa, 1971).

II.2.3. γ - δ -Dioxoalderato transaminasa

Existen evidencias que permiten demostrar la existencia de un camino alternativo de formación de ALA.

Beale y Castelfranco (1974) observaron que en hojas etioladas enverdecidas de cebada y porotos, y en cotiledones de pepino, el glutamato* o α -cetoglutarato* incorporaban su marca en el ALA mientras que el ^{14}C de la succinil CoA o de la glicina no se utilizaba significativamente. Se encontró además que el carbono 1 del glutamato se convierte en el carbono 5 del ALA (Beale y col., 1975) a través del α -cetoglutarato y el γ - δ -dioxoalderato (DOVA), por acción de las transaminasas correspondientes (Figura II.5.).

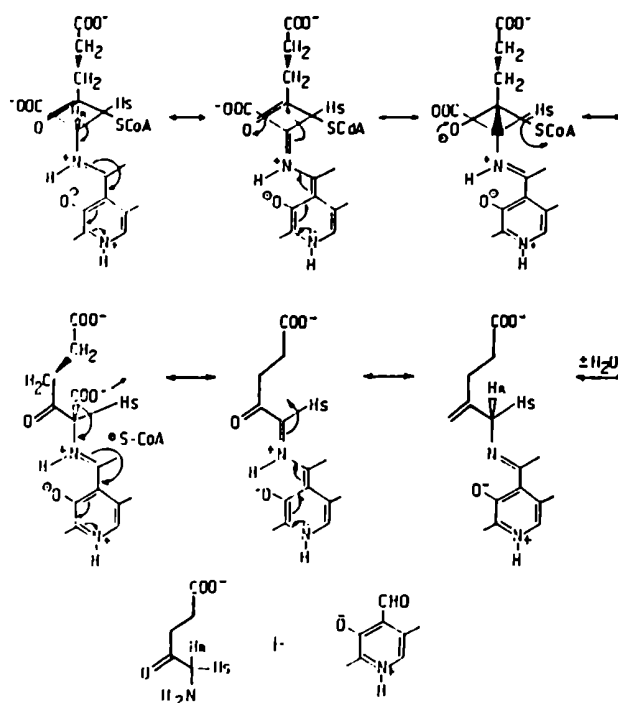


FIGURA II.4.: Mecanismo propuesto para la formación enzimática de ALA

En un principio se pensó que esta vía operaba solamente en plantas superiores (Beal y Castelfranco, 1974; Lohr y Friedmann, 1974; Porra y Klein, 1981; Harel y col., 1983) y en algas (Gassman y col., 1968; Kipe Nolt y Stevens Jr., 1980; Foley y Beale, 1982; Meishc y col., 1983; Shioi y col., 1984). Sin embargo, hay evidencias de actividad de DOVA-T en tejidos de origen animal (Kowalski y col., 1959; Varticovski y col., 1980; Noguchi y Mori, 1981), en bacterias (Gibson y col., 1961; Bajkowski y Friedmann, 1982) e incluso en una mutante del alga verde *Scenedesmus obliquus* (Klein y Senger, 1978), en *Rp. spheroides* (Kikuchi y col., 1958; Gibson y

col., 1961) y en *Euglena gracilis* (Salvador, 1978; Weinstein y Beale, 1983; Lombardo y col., 1988).

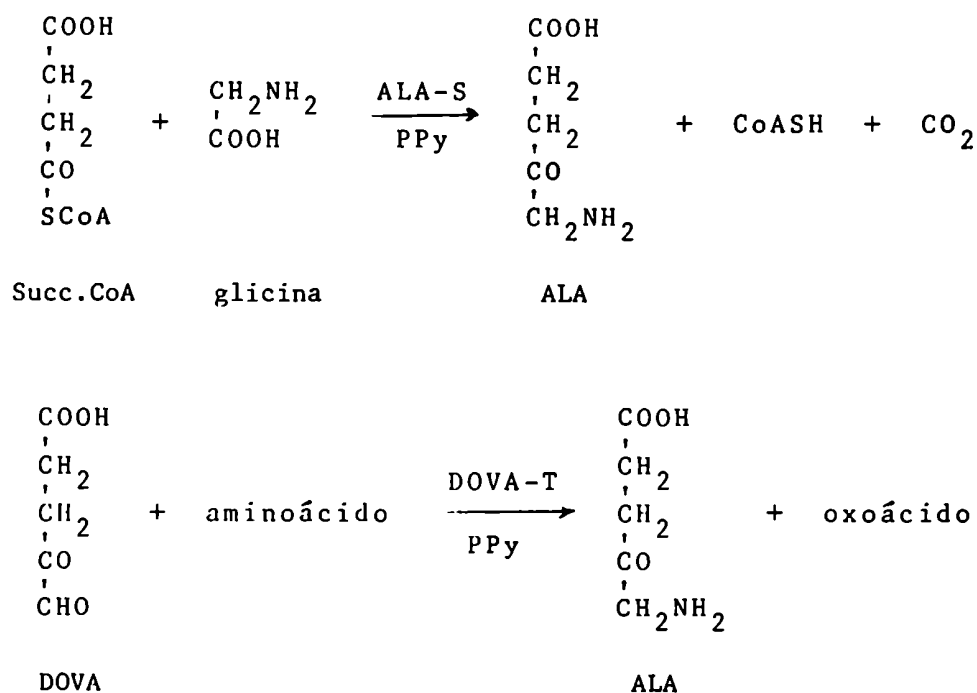


FIGURA II.5.: Vías alternativas de formación de ALA.
DOVA-T: DOVA transaminasa

Si bien se desconoce el rol que desempeña esta síntesis alternativa, es probable que los dos caminos operen en la célula y que, uno o ambos, cumplan un papel importante en la regulación de la biosíntesis de hemo y/o clorofila.

II.2.4. Acido δ -aminolevúlico dehidrasa

La segunda enzima específica del camino biosintético de las porfirinas es el ALA-D o porfobilinógeno sintetasa (PBG-S), que cataliza la condensación de dos moléculas de ALA para formar el monopirrol porfobilinógeno (PBG). Es una zinc metaloenzima, típicamente sulfhidrúlica y termoestable. Se encuentra localizada en el citoplasma, lo cual significa que el ALA, una vez sintetizado en la mitocondria, debe difundir hacia el citoplasma donde será convertido en PBG.

Esta enzima se aisló de numerosas fuentes, tanto

animales como vegetales, lográndose su cristalización a partir de hígado vacuno (Shemin, 1976).

Se comprobó que el ALA-D purificada de eritrocitos e hígado de rata (Finelli y col., 1974, 1975) y de hígado vacuno (Chch y Neilands, 1973; Tsukamoto y col., 1979) requiere la presencia de activadores de grupos sulfhidrilos y zinc para presentar su actividad máxima. Asimismo, es inhibida por agentes bloqueantes de sulfhidrilos (Sassa y col., 1975) y quelantes como EDTA, que desplazan al zinc de la estructura proteica (Finelli y col., 1975; Tsukamoto y col., 1979).

Por su parte, el plomo es un potente inhibidor, si bien su efecto se revierte por el agregado de reactivos tiólicos o por zinc (Granick y col., 1973; Finelli y col., 1975).

En la mayoría de los tejidos, el ALA-D tiene una actividad 100 veces mayor que la del ALA-S; y también es la que se encuentra en mayor cantidad comparada con el resto de las enzimas del camino. No obstante, una marcada inhibición en la actividad de ALA-D produce una disminución en la velocidad de formación del hemo (Ebert y col., 1979).

El peso molecular de la enzima proveniente de diversas fuentes coincide en un valor de 280.000. Estudios posteriores empleando agentes disociantes demostraron que el ALA-D de hígado bovino es un oligómero formado por 8 subunidades muy similares de peso molecular 35.000 (Wu' y col., 1974; Shemin, 1976). Batlle y col. (1978) postularon que la estructura mínima necesaria para la actividad catalítica es un dímero funcional.

Estudios realizados sobre el sitio activo de la enzima demostraron que por subunidad funcional están involucradas, una o dos moléculas de lisina, dos residuos cisteicos, dos de histidina y un átomo de zinc.

En 1968, el grupo de Shemin (Nandi y Shemin, 1968) propuso un mecanismo de acción que en principio aún es válido, aun que posteriormente se fue modificando. En la Figura 11.6. se ilustra el esquema propuesto por Batlle y Stella (1978), en él dos moléculas de ALA se condensan por medio de una síntesis de pirroles de Knorr. Más recientemente, se demostró que la primer molécula de sustrato que se une a la enzima es la que aporta la cadena propiónica del PBG (Jordan y Seehra, 1980); mientras que la segunda molécula de ALA es la que forma la base de Schiff

entre el grupo carbonilo en γ del ALA y un ϵ -amino de una lisina del sitio activo de la enzima, dando lugar así al grupo acético del pirrol.

II.2.5. Porfobilinogenasa

La PBG-asa, complejo enzimático constituido por las enzimas deaminasa e isomerasa, cataliza la condensación de cuatro moléculas de PBG para formar el Urogen III.

Las características, propiedades y mecanismo de acción de esta enzima, así como todo lo referente a sus componentes enzimáticos, será descrito detalladamente en un Capítulo aparte.

II.2.6. Uroporfirinógeno decarboxilasa

La etapa siguiente en el camino biosintético del hemo involucra la decarboxilación de las cuatro cadenas laterales de ácido acético del Urogen, a 4 restos metilos del Coprogen. Esta reacción está catalizada por la uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D) o uroporfirinógeno carboxiliasa.

La detección de intermediarios de 7, 6 y 5 carboxilos durante la decarboxilación enzimática (Batlle y Grinstein, 1962 a, b; 1964 a,b; San Martín de Viale y Grinstein, 1968) sugirió que el proceso se lleva a cabo en etapas. Sin embargo, hasta el momento, sólo se aisló una única proteína que no se pudo desdoblarse en subunidades activas. Este hecho apoya la hipótesis de que la decarboxilasa posiblemente sea una enzima con dos o más sitios activos que actuaría en forma secuencial sobre el sustrato. Así, Elder y Tovey (1977) propusieron que la URO-D consistiría en una única proteína formada por dos subunidades y que existirían dos sitios catalíticos por molécula de enzima, de acuerdo con los resultados de Tomio y col. (1970). Sin embargo, estudios más recientes indicarían que la URO-D podría consistir en un monómero de peso molecular 40.000 (De Verneuil y col., 1983; Elder y col., 1983) o su dímero de peso molecular 80.000 (Kawanishi y col., 1983), aunque de todos modos las cuatro decarboxilaciones serían llevadas a cabo por una única proteína monomérica que podría estar formada a su vez por dos subunidades idénticas muy unidas entre las cuales se ubicarían el o los sitios activos y además sitios adicionales de encaje para el sustrato (Koopmann y col., 1986; Koopmann y Batlle, 1987).

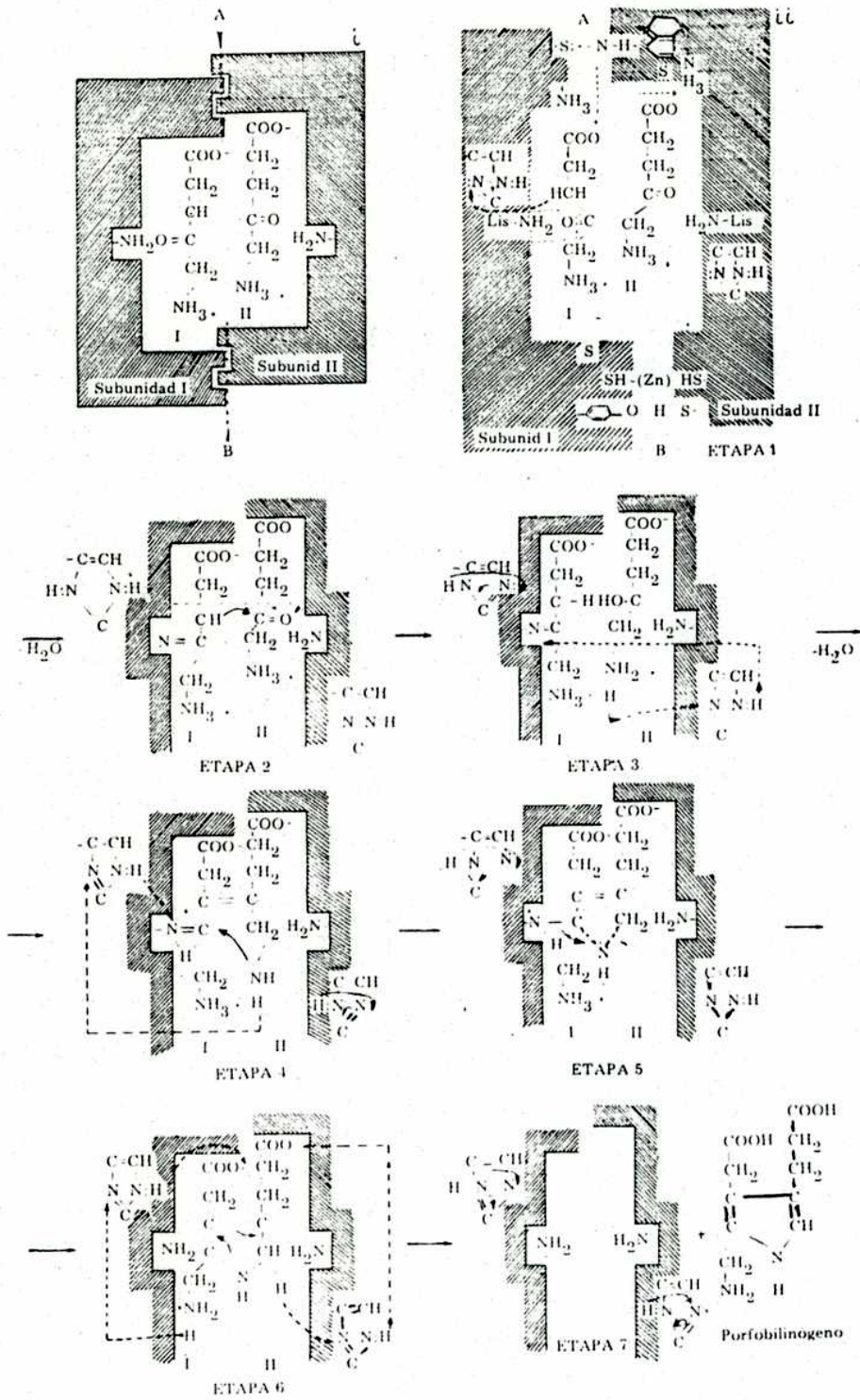


FIGURA II.6.: Mecanismo de acción del ALA-D

Fue aislada y estudiada en numerosos tejidos, tales como *Chlorella vulgaris* (Bogorad, 1955, 1958; Granick, 1955 a), *Rp. spheroides* (Hoare y Heath, 1958, 1959; Chu y Chu, 1970), *Rp. palustris* (Koopmann y col., 1986), bazo de ratón (Romeo y Levin, 1971), eritrocitos de ave (Falk y col., 1956; Neve y col., 1956; Hoare y Heath, 1958; Batlle y Grinstein, 1962 b, 1964 b; García, 1973) y humanos (Conford, 1964; Rasmussen y Kushner, 1979; de Verneuil y col., 1980; Elder, 1982), glándula de Harder (Tomio y Grinstein, 1968), hígado de rata (Aragonés y col., 1972; Smith y Francis, 1979, 1981; Kardish y Woods, 1980), hígado de cerdo y reticulocitos de conejo (Mauzerall y Granick, 1958).

La decarboxilasa es una enzima citoplasmática, sulfhidrónica, termolábil, con la excepción de la de *Rp. palustris* (Koopmann y col., 1986) y de alta especificidad hacia los grupos acético. Sin embargo, puede decarboxilar los cuatro isómeros del Urogen con distinta velocidad: III > IV > II > I (Granick y Mauzerall, 1958 b; Conford, 1964; Smith y Francis, 1979) y su afinidad disminuye al decrecer el número de grupos carboxílicos del sustrato. Se encontró además, que el Km para el isómero III es siempre menor que para el isómero I (de Verneuil y col., 1980).

In vitro, la actividad enzimática se inhibe por la presencia de mercurio (II), cobre (II), iodoacetamida y PCMB, pudiendo revertirse este efecto por el agregado de GSH, todo lo cual confirma que la decarboxilasa es una proteína sulfhidrónica.

Es además, una enzima generalmente anaeróbica, y si bien este efecto podría deberse a la oxidación de los sustratos, no puede descartarse un efecto directo del oxígeno sobre la enzima misma (Bogorad, 1958; Hoare y Heath, 1958; Mauzerall y Granick, 1964 b, Batlle y Grinstein, 1964; San Martín de Viale y Grinstein, 1968; Tomio y col., 1970; Koopmann y col., 1986).

En cuanto al mecanismo de acción de la decarboxilasa, sólo se pudo establecer cuál es la ruta de decarboxilación del Urogen III al Coprogen III; lo cual constituyó un problema sumamente complejo, pues en teoría, por decarboxilaciones sucesivas de las 4 cadenas laterales de ácido acético podrían existir 24 rutas posibles. Sin embargo, Jackson y col. (1976) sintetizaron todos los intermediarios posibles de 7 (hepta), 6 (hexa) y 5 (pentaporfirinógeno) carboxilos y con ellos lograron dilucidar cuál

es la vía natural de decarboxilación del Urogen III. Se llegó así a la conclusión de que ésta tiene lugar de una manera tal que el sustrato se ubicaría sobre la enzima, iniciándose la reacción sobre el resto acetato del anillo D, y continuando sobre los restos acetato de los anillos A, B y C, hasta formar Coprogen III (Figura II.7.); es decir, parecería que el Urogen III una vez ubicado en el sitio activo se desplazaría sobre la superficie de la enzima en el sentido de las agujas del reloj.

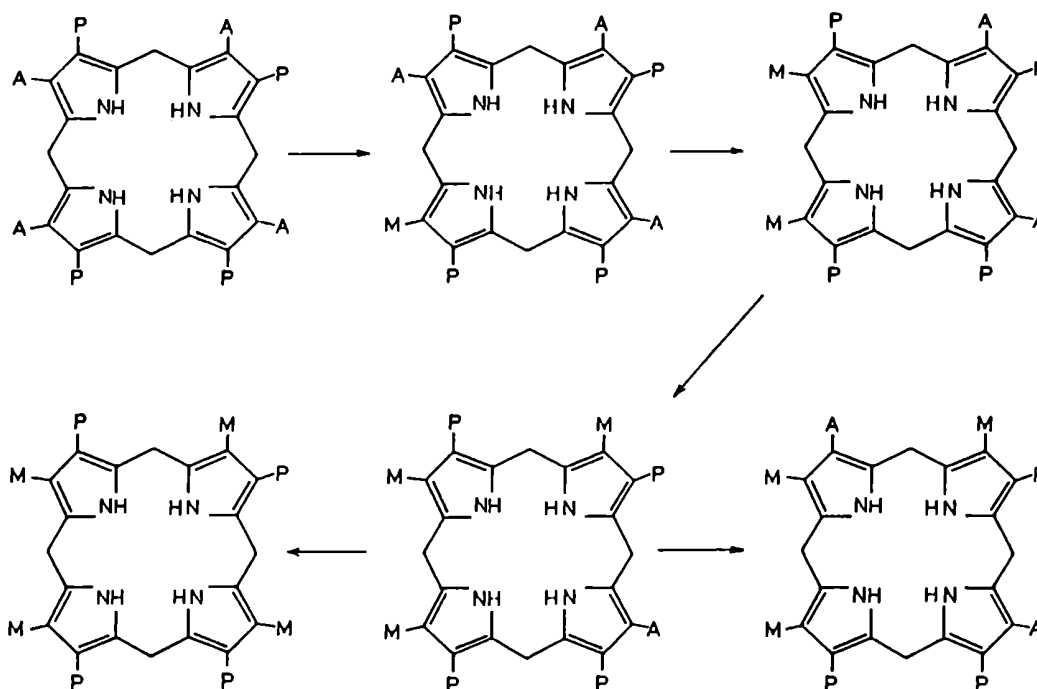


FIGURA II.7.: Decarboxilación enzimática del Urogen III mediada por la URO-D

Contrariamente a lo que ocurre con la decarboxilación ordenada del isómero III, el Urogen I se transforma en Coprogen I por acción de la URO-D, la cual en este caso utiliza indistintamente las dos vías posibles para la decarboxilación (Figura II.8.) (Jackson y col., 1977). Estudios recientes llevados a cabo con la enzima de *Rp. palustris* indicaron que además, la cinética de la reacción se modifica según se emplee el isómero I ó III como sustrato, siendo la decarboxilación del heptaporfirínogeno el paso limitante de la velocidad cuando se parte de Urogen III, mientras que si se usa Urogen I, la reacción procede rápidamente hasta la formación de pentaporfirínogeno (Pentagen) I,

constituyendo ahora la eliminación del último grupo carboxilo el paso limitante (Koopmann y col., 1986).

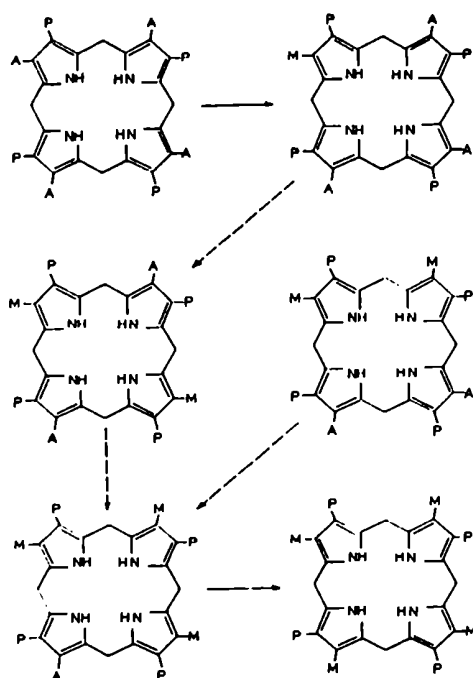


FIGURA II.8.: Decarboxilación enzimática del Urogen I mediada por la URO-D

II.2.7. Coproporfirinogenasa

La conversión de Coprogen III a protoporfirinógeno (Proto_gen) IX, mediante la decarboxilación oxidativa de dos grupos propionilos de los anillos A y B a grupos vinilos, se lleva a cabo por acción de la coproporfirinogenasa (CPG-asa), coproporfirinógeno decarboxilasa, coproporfirinógeno oxidasa o simplemente coprogenasa.

Esta enzima se aisló de varias fuentes, tales como *Chlorella vulgaris* (Granick, 1955 b), hemolizados de eritrocitos de ave (Dressel y Falk, 1956), *Euglena gracilis* (Granick y Mauzerall, 1958 a), hígado vacuno (Sano, 1958; Sano y Granick, 1961; Porra y Falk, 1964), hígado de rata (Batlle y col., 1965; Elder y col., 1978; Grandchamp y col., 1978), hígado de buey

(Porra y Falk, 1964), hojas de tabaco (Hsu y Miller, 1970), diversas bacterias (Jacobs y col., 1970), linfocitos humanos (Grandchamp y Nordmann, 1977) y bazo de rata (Kardish y Woods, 1980).

En todas las células estudiadas, la CPG-asa es una enzima mitocondrial (Granick y Mauzerall, 1958 a; Rimington y Tooth, 1961; Sano y Granick, 1961; Batlle y col., 1965). Es altamente específica para el Coprogen III, no utiliza el isómero I y II como sustrato (Porra y Falk, 1964), aunque puede actuar sobre el Coprogen IV dando como producto final la protoporfirina XIII (Al-Hazimi y col., 1976).

Es importante destacar que esta enzima tiene un requerimiento absoluto por oxígeno molecular (Falk y col., 1953; Sano y Granick, 1961) el cual actuaría como único aceptor de hidrógenos no pudiendo ser reemplazado por ningún otro oxidante; no obstante, en organismos estrictamente anaeróbicos que biosintetizan porfirinas, debe existir algún otro sistema capaz de actuar como aceptor de hidrógenos. Tait (1969, 1972) empleando la enzima de *Rp. spheroides* propuso que en estos casos existiría un sistema aceptor constituido por ATP, magnesio y L-metionina. Se comprobó que esta CPG-asa anaeróbica es funcional en otros organismos tales como *Chromatium D* (Mori y Sano, 1968; Tait, 1972), *Saccharomyces cerevisiae* (Poulson y Polglase, 1974) y *Rhizobium japonicum* (Keithly y Nadler, 1983).

El peso molecular de la CPG-asa de diversas fuentes parece coincidir en un valor de 80.000 (Batlle y col., 1965; Poulson y Polglase, 1974; Yoshinaga y Sano, 1980) y mediante el empleo de agentes disociantes se determinó que la enzima es una proteína monomérica (Yoshinaga y Sano, 1980). El estudio de la estructura primaria de la coprogenasa indicó que es una proteína rica en residuos aminoacídicos aromáticos.

Además, a pesar de tener 9,5 grupos sulfhidrilos por mol de enzima, su actividad no se altera significativamente cuando están presentes reactivos sulfhidrúlicos.

En la elucidación del mecanismo de acción de la coprogenasa, tuvo gran importancia la detección y aislamiento a partir de diversas fuentes naturales y biosintéticas de una porfirina tricarbóxilica. Este compuesto resultó ser un derivado de la Copro III, con un resto vinilo en la posición 2 del anillo A

(Kennedy y col., 1970 a, b) llamada harderoporfirina, pues fue aislada por primera vez de la glándula de Harder. Con estas investigaciones y con el aporte de análogos sintéticos (Games y col., 1976) se propuso que la decarboxilación oxidativa de los restos propionato se produce en etapas; el proceso comenzaría por el anillo A siguiendo, como en el caso de la URO-D, en el sentido de las agujas del reloj.

Rimington y Tooth (1961) habían postulado como intermediario de reacción una acrílicoporfirina; sin embargo, posteriormente se comprobó que el isómero trans de la 2-4 acrílico deuteroporfirina no actúa como sustrato (Sano y Granick, 1961; Batlle y Rimington, 1966). Restaba aún la posibilidad de que el isómero cis fuera el verdadero intermediario (Batlle y col., 1965). En 1966, Batlle y Rimington propusieron, como primera etapa en este proceso, una oxidación del resto propionato a un α -hidroxilpropionato (Figura II.9.). En el mismo año, Sano (1966) sintetizó una mezcla de isómeros de este compuesto y demostró su incorporación en protoporfirina por acción de la coprogenasa.

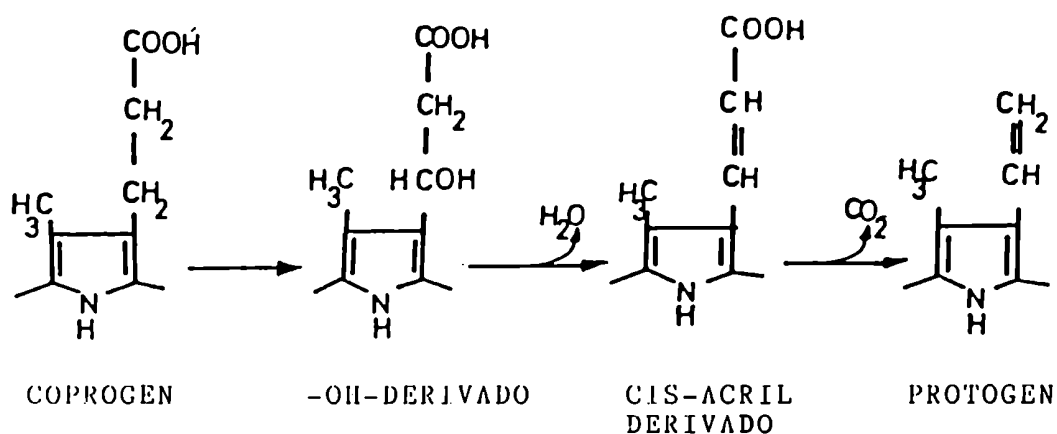


FIGURA II.9.: Mecanismo de decarboxilación del coproporfirínogeno III en protoporfirínogeno IX

Más tarde, French y col. (1970) aislaron, a partir de materiales biológicos, la porfirina S-411 cuya estructura respondía a la de una porfirina tricarbóxica derivada de la Copro III, con un sustituyente cis-acrilato en la posición 2 del anillo A.

Estudios posteriores realizados empleando precursores

marcados específicamente (Zaman y col., 1972), indicaron que la porfirina S-411 no es un intermediario normal en la biosíntesis de porfirinas. En 1976, el grupo de Jackson interpretó estos resultados sugiriendo que la porfirina S-411 podría provenir de un camino anormal y que el α -hidroxipropionil derivado podría eliminar agua y decarboxilarse simultáneamente a vinilo (Jackson y col., 1976). Sin embargo, no puede descartarse totalmente la ruta esquematizada en la Figura II.9.

Más recientemente, se realizaron estudios cinéticos empleando preparaciones crudas y purificadas de distintas fuentes, los cuales arrojaron evidencias adicionales acerca de la formación de intermediarios hidroxilados (Jackson y col., 1980).

Por su parte, Yoshinaga y Sano (1980) usando la enzima purificada de hígado de vaca, demostraron que la conversión de los grupos propionato a vinilos ocurre en dos etapas, de la posición 2 a la 4, mediante la formación de un β -hidroxilpropionil porfirinógeno como intermediario.

II.2.8. Protoporfirinógeno IX oxidasa

La protoporfirinógeno IX oxidasa o protogen oxidasa cataliza la conversión del Protogen IX en Proto IX, durante la cual se eliminan 6 átomos de hidrógeno.

En 1967, Labbe y col. reportaron en *S. cerevisiae* la presencia de un pigmento que por su espectro de absorción y reacciones químicas se comportaba como una tetrahidroporfirina y se supuso que podría provenir de la reducción de la Proto IX o autooxidación del Protogen IX.

Años más tarde, Poulson y Polglase (1973) detectaron, en la misma fuente, un pigmento que poseía una banda de absorción típica a 503 nm, por lo cual lo designaron como P₅₀₃. Estos autores supusieron que este compuesto podría ser un intermediario en la biosíntesis de Proto IX (Figura II.10.); comprobándose posteriormente que era una prototetrahidroporfirina IX (Kamitakahara y col., 1973). Este mismo grupo purificó y caracterizó la enzima de *S. cerevisiae* y de mitocondrias de hígado de rata resultando ser un proteína mitocondrial, sulfhidrúlica y termolábil, que no utiliza como sustratos al Coprogen I ó III, ni al Urogen I o III. Posee además, un estricto requerimiento por oxígeno molecular (Poulson y Polglase, 1975).

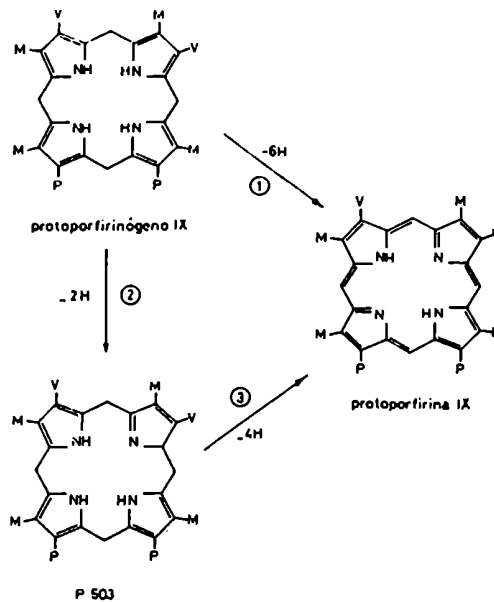


FIGURA II.10.: Esquema de oxidación del Protogen IX a Proto IX

Por otra parte, se determinó el peso molecular de la enzima de *S. cerevisiae* y de hígado de rata, resultando ser de 180.000 y 35.000 respectivamente (Poulson, 1976).

Finalmente, Jackson y col. (1974) y Smith y col. (1976) demostraron que el proceso de oxidación llevado a cabo por la protogen-oxidasa es estereoespecífico.

II.2.9. Ferroquelatasa

La ferroquelatasa, denominada también hemosintetasa o protohemoferroliasa, cataliza la última etapa en la biosíntesis de hemo, que es la inserción del hierro en la Proto IX.

El estudio de la quelación enzimática de las porfirinas es muy complejo, dado que la velocidad de la reacción no enzimática es muy grande. Es por este motivo, que durante muchos años se discutió la existencia de la ferroquelatasa. Sin embargo, en

1956 dos grupos de trabajo confirmaron la naturaleza enzimática de la reacción (Goldberg y col., 1956; Krueger y col., 1956).

Esta enzima se estudió en gran variedad de tejidos, entre los que se encuentran: hígado de cerdo (Jones y Jones, 1970) y de rata (Labbe y Hubbard, 1961; Porra y Jones, 1963; Yoneyama y col., 1965; Llambías, 1976); eritrocitos de ave (Goldberg y col., 1956; Krueger y col., 1956; Minakami y col., 1959; Yoneyama y col., 1962; Hanson y Dailey, 1984); levaduras (Reithmueller y Tuppy, 1964); *Rp. spheroides* (Porra y Lascelles, 1965), *Chromatium D*, *Thiobacillus X*, *E. coli*, *Clostridium welchii* y *S. cerevisiae* (Porra y Jones, 1963); semillas de cebada etioldas (Goldin y Little, 1969); mitocondrias de papa, hojas de habas, de avena, de espinaca (Porra y Lascelles, 1965; Jones, 1968); en médula ósea humana (Bottomley, 1968) y hepatocitos de ratón (Cole y col., 1981).

La ferroquelatasa es una enzima mitocondrial, sulfhidrónica y requiere fosfato de piridoxal, el cual parecería estar fuertemente unido a la proteína.

Ciertos cationes bivalentes como manganeso y plomo la inactivan significativamente. El oxígeno es otro fuerte inhibidor.

Es destacable que esta enzima es altamente específica por el hierro, lo cual es muy significativo dado que *in vivo* la ferroquelatasa debe seleccionar al hierro frente a una gran variedad de cationes divalentes (Labbe y Hubbard, 1961; Yoneyama y col., 1962).

En cuanto a su especificidad por las porfirinas, se comprobó que además de Proto IX, pueden actuar como sustratos *in vitro* la mesoporfirina y deuteroporfirina. Sin embargo, en la célula sólo se encuentra disponible la protoporfirina y por lo tanto, no se forman otros hemo-derivados (Porra y Jones, 1963; Johnson y Jones, 1964; Jones y Jones, 1969).

Finalmente señalaremos que la ferroquelatasa es una lipoproteína, el agregado de fracciones fosfolipídicas es esencial para su actividad aumentándola hasta alcanzar valores normales (Yoshikawa y Yoneyama, 1964; Sawada y col., 1969; Yoneyama y col., 1969); por lo tanto, no se ha podido aún aislar la forma soluble de la enzima.

II.3. REFERENCIAS

- Al-Hazimi, H.; Jackson, A. & Ryder, D. (1976) J. Chem. Soc. Chem. Comm., 188.
- Aoki, Y.; Wada, O.; Urata, G.; Takaku, F. & Nakao, K. (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm. 42, 468.
- Aoki, Y.; Urata, G.; Takaku, F. & Katsumura, N. (1975) Biochem. Biophys. Res. Comm. 65, 567.
- Aragonés, A.; García, R.; San Martín de Viale, L.; Tomio, M. & Grinstein, M. (1972) An. Asoc. Qca. Arg. 60, 239.
- Bajkowski, A. & Friedmann, H. (1982) J. Biol. Chem. 257, 2207.
- Batlle, A. & Grinstein, M. (1962 a) Biochim. Biophys. Acta 57, 191.
- Batlle, A. & Grinstein, M. (1962 b) Biochim. Biophys. Acta 62, 197.
- Batlle, A. & Grinstein, M. (1964 a) Biochim. Biophys. Acta 82, 1.
- Batlle, A. & Grinstein, M. (1964 b) Biochim. Biophys. Acta 82, 13.
- Batlle, A. & Rimington, C. (1966) Ciencia e Inv. 22, 369.
- Batlle, A. & Stella, A. (1978) Int. J. Biochem. 9, 861.
- Batlle, A.; Benson, A. & Rimington, C. (1965) Biochem. J. 97, 731.
- Batlle, A.; Llambías, E.; Wider de Xifra, E. & Tigier, H. (1975) Int. J. Biochem. 6, 591.
- Batlle, A.; Stella, A.; Ferramola, A.; Sopena Y.; Wider de Xifra, E. & Sancovich, H. (1978) Int. J. Biochem. 9, 401.
- Batlle, A.; Xifra, E. & Magnin, P. (1981) en "Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento" (Ed. EUDEBA).
- Beale, S. & Castelfranco, P. (1974) Plant Physiol. 53, 297.
- Beale, S.; Gough, S. & Granick, S. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2719.
- Bogorad, L. (1955) Science 121, 878.
- Bogorad, L. (1958) J. Biol. Chem. 233, 516.
- Bottomley, S. (1968) Blood 31, 314.

- Cole, S.; Massey, T.; Marks, G. & Racz, W. (1981) *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 59, 1155.
- Cornford, P. (1964) *Biochem. J.* 91, 64.
- Cheh, A. & Neilands, J. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 1060.
- Chu, T. & Chu, E. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 215, 377.
- de Verneuil, H.; Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 611, 174.
- de Verneuil, H.; Sassa, S. & Kappas, A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2454.
- Dressel, E. & Falk, J. (1956) *Biochem. J.* 63, 80.
- Ebert, P.; Hess, P.; Frykholm, B. & Tschy, D. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 88, 1382.
- Elder, G. (1982) en "Abstracts VIIITH Tetrapyrrole Meeting". Southampton.
- Elder, G. & Tovey, J. (1977) *Biochem. J.* 5, 1970.
- Elder, G.; Evans, J.; Jackson, J. & Jackson, A. (1978) *Biochem. J.* 169, 215.
- Elder, G.; Tovey, J. & Shepard, D. (1983) *Biochem. J.* 215, 45.
- Falk, J.; Dressel, E. & Rimington, C. (1953) *Nature* 172, 292.
- Falk, J.; Dressel, E.; Benson, A. & Knight, B. (1956) *Biochem. J.* 63, 87.
- Finelli, V.; Murthy, L.; Peirand, W. & Petering, H. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60, 1418.
- Finelli, V.; Klauder, D.; Karaffa, M. & Petering, H. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 303.
- Foley, T. & Beale, S. (1982) *Plant Physiol.* 70, 1495.
- French, J.; Nicholson, D. & Rimington, C. (1970) *Biochem. J.* 120, 393.
- Games, D.; Jackson, A. & Jackson, J. (1976) *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 187.
- García, R. (1973) Tesis Doctoral (UBA).
- Gassman, M.; Pluscec, J. & Bogorad, L. (1968) *Plant Physiol.* 43, 1411.

- Gibson, K.; Matthew, M.; Neuberger, F. & Tait, G. (1961) Nature 192, 204.
- Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1977) Biochem. Biophys. Acta Comm. 74, 1089.
- Grandchamp, B.; Phung, N. & Nordmann, Y. (1978) Biochem. J. 176, 97.
- Granick, S. (1955 a) Absts. 128th Meeting Am. Chem. Soc. 69 C.
- Granick, S. (1955 b) en "CIBA Foundation Symposium on Porphyrins" Biosynthesis and Metabolism (Ed. G. Wostenholme y Miller), p.143. E.C.P. London.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958 a) Fed. Proc. 17, 233.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958 b) J. Biol. Chem. 232, 1119.
- Granick, S. & Sassa, S. (1971) en "Metabolic Regulation" (Ed. H. J. Vogel), vol. 5, p. 77. Metabolic Pathways. Academic Press, N.Y.
- Granick, J.; Sassa, S.; Granick, S.; Levere, R. & Kappas, A. (1973) Biochem. Med. 8, 149.
- Goldberg, A.; Ashenbrucker, H.; Cartwright, G. & Wintrobe, N. (1956) Blood 11, 821.
- Goldin, B. & Little, H. (1969) Biochim. Biophys. Acta 171, 321.
- Hanson, J. & Dayley, H. (1984) Biochem. J. 222, 695.
- Harel, E.; Ne'eman, E. & Meller, E. (1983) Plant Physiol. 72, 1056.
- Hayashi, N.; Yoda, B. & Kikuchi, G. (1969) Arch. Biochim. Biophys. 131, 83.
- Hoare, D. & Heath, H. (1958) Nature 181, 1592.
- Hoare, D. & Heath, H. (1959) Biochem. J. 73, 679.
- Hsu, W. & Miller, G. (1970) Biochem. J. 117, 215.
- Jackson, A.; James, P.; Couch, P.; Jackson, J.; Belcher, R. & Smith, S. (1974) Enzyme 17, 81.
- Jackson, A.; Sancovich, H.; Ferramola, A.; Evans, N.; Games, D.; Matlin, S.; Elder, G. & Smith, S. (1976) Phil. Trans. R. Soc. London 273, 191.
- Jackson, A.; Nagarajad, K.; Supphayen, O. & Smith, S. (1977) J. Chem. Comm., 696.
- Jackson, A.; Jones, D.; Philip, G.; Lash, T.; Battle, A. & Smith, S. (1980) Int. J. Biochem. 12, 681.

- Jacobs, N.; Jacobs, J. & Brent, P. (1970) *J. Bact.* 102, 398.
- Johnson, A. & Jones, O. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 93, 171.
- Jones, O. (1968) *Biochem. J.* 107, 113.
- Jones, M. & Jones, O. (1969) *Biochem. J.* 113, 507.
- Jones, M. & Jones, O. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1072.
- Jordan, P. & Seehra, J. (1980) *J.C.S. Chem. Comm.*, 240.
Kamitakahara, R.; Pearlstone, J.; Poulson, R. & Polglase, R.
(1973) *Can. J. Microb.* 19, 1239.
- Kardish, R. & Woods, J. (1980) *J. Appl. Biochem.* 2, 159.
- Kaufman, S. (1951) en "Phosphorus Metabolism" (Ed. Mc Elvery),
vol. 1, p. 370. W. Glass, Baltimore, USA.
- Kawanishi, S.; Soki, Y. & Sano, S. (1983) *Biochim. Biophys.
Acta* 28, 219.
- Keithly, J. & Madler, K. (1983) *J. Bacteriol.* 154 (2), 838.
- Kennedy, G.; Jackson, A.; Kenner, G. & Suckling, G. (1970 a)
FEBS lett. 6, 9.
- Kennedy, G.; Jackson, A.; Kenner, G. & Suckling, G. (1970 b)
FEBS lett. 7, 205.
- Kikuchi, G.; Kumer, A.; Talmage, D. & Shemin, D. (1958) *J.
Biol. Chem.* 233, 1214.
- Kipe-Nolt, J. & Stevens, S. J.r (1980) *Plant Physiol.* 65, 126.
- Klein, O. & Senger, H. (1978) *Plant Physiol.* 62, 10.
- Koopmann, G. & Batlle, A. (1987) *Int. J. Biochem.* 19 (4), 373.
- Koopmann, G.; Juknat de Geralnik, A. & Batlle, A. (1986) *Int.
J. Biochem.* 18 (10), 935.
- Kowalski, E.; Danciewicz, A.; Szot, Z.; Lipinski, B. & Rosiek,
O. (1959) *Acta Biochim. Pol.* 6, 257.
- Krueger, R.; Melnick, I. & Klein, J. (1956) *Arch. Biochem.
Biophys.* 64, 302.
- Labbe, R. & Hubbard, R. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 52, 130.
- Labbe, R.; Volland, C. & Chaix, P. (1967) *Biochim. Biophys.
Acta* 143, 70.
- Lohr, J. & Friedmann, H. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 69, 908.

- Lombardo, M.; Araujo, L.; Juknat, A. & Batlle, A. (1988) *Comp. Biochem. Physiol.* (en prensa)
- Llambías, E. (1976) *Int. J. Biochem.* 7, 33.
- Marver, H.; Collins, A.; Tschudy, D. & Recheige, M. Jr. (1966) *J. Biol. Chem.* 241,
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 1141.
- Meisch, H.; Hoffmann, H. & Reinle, W. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 743, 281.
- Minakami, S.; Kagawa, Y.; Sugita, Y.; Yoneyama, Y. & Yeshikawa, H. (1959) *Biochim. Biophys. Acta* 35, 569.
- Mori, M. & Sano, S. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 61.
- Nandi, D. (1978 a) *Arch. Biochem. Biophys.* 188, 266.
- Nandi, D. (1978 b) *J. Biol. Chem.* 253, 8872.
- Nandi, D. & Shemin, D. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1236.
- Neve, R.; Labbe, R.; Aldrich, R. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, 691.
- Nishimura, J. & Grinnel, F. (1972) en "Advances in Enzymology" (Ed. Meister) vol. 36, p. 183. Wiley & Son. Chicester.
- Noguchi, T. & Mori, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 10335.
- Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 34.
- Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1979) *J. Biochem. (Tokyo)* 85, 239.
- Paterniti, J. Jr. & Beattie, D. (1979) *J. Biol. Chem.* 253, 6112.
- Patton, G. & Beattie, D. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 4467.
- Poulson, R. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 3730.
- Poulson, R. & Polglase, W. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 359, 256.
- Poulson, R. & Polglase, W. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 6367.
- Poulson, R. & Polglase, W. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 1269.
- Porra, R. & Falk, J. (1964) *Biochem. J.* 90, 69.
- Porra, R. & Jones, O. (1963) *Biochem. J.* 87, 181.
- Porra, R. & Klein, (1981)
- Porra, R. & Lascelles, J. (1965) *Biochem. J.* 94, 120.

- Rasmussen, G. & Kushner, J. (1979) J. Lab. Clin. Med. 93, 54.
- Reithmueller, G. & Tuppy, H. (1964) Biochem. Z. 340, 413.
- Rimington, C. & Tooth, B. (1961) J. Biochem. (Tokyo) 49, 456.
- Romeo, G. & Levin, E. (1971) Biochim. Biophys. Acta 230, 330.
- Salvador, G. (1978) Plant Sci. Lett. 13, 351.
- San Martín de Viale, L. & Grinstein, M. (1968) Biochim. Biophys. Acta 158, 79.
- Sano, S. (1958) Acta Haematol. Japan 21, 237.
- Sano, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5276.
- Sano, S. & Granick, S. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1473.
- Sassa, S. & Granick, S. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 517.
- Sassa, S.; Granick, S. & Kappas, A. (1975) Ann. N.Y. Acad. Sci. 244, 419.
- Sawada, H.; Takeshita, M.; Sugita, Y. & Yoneyama, Y. (1969) Biochim. Biophys. Acta 178, 145.
- Shemin, D. (1976) Phil. Trans. R. Soc. London B 273, 109.
- Shioi, Y.; Nagamine, M. & Sassa, T. (1984) Arch. Biochem. Biophys. 234, 117.
- Smith, A. & Francis, J. (1979) Biochem. J. 183, 455.
- Smith, A. & Francis, J. (1981) Biochem. J. 195, 241.
- Smith, S.G.; Jackson, A.H.; & Jackson, J.R. (1976) Ann. Clin. Res. 8 Suppl. 7, 53.
- Tait, G. (1969) Biochim. Biophys. Res. Commun. 37, 116.
- Tait, G. (1972) Biochem. J. 128, 1159.
- Tomio, J. & Grinstein, M. (1968) Eur. J. Biochem. 6, 80.
- Tomio, J.; García, R.; San Martín de Viale, L. & Grinstein, M. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198, 353.
- Tschudy, D.; Marver, H. & Collins, A. (1965) Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 480.
- Tsukamoto, J.; Yoshinaga, T. & Sano, S. (1979) Biochim. Biophys. Acta 570, 167.
- Varticovski, L.; Kushner, J. & Burnham, B. (1980) J. Biol. Chem. 255, 3742.

- Weinstein, J. & Beale, S. (1983) J. Biol. Chem. 258, 6799.
- Whiting, M. & Elliot, W. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6818.
- Whiting, M. & Granick, S. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1340.
- Wider de Xifra, E. & Batlle, A. (1973) Enzyme 16, 128.
- Wider de Xifra, E. & Batlle, A. (1974) Int. J. Biochem. 5, 129.
- Wider de Xifra, E. & Batlle, A. (1976) en "Porphyrins Human Diseases" (Ed. M. Doss), vol. 25. Karger, Basel.
- Wider de Xifra, E. & Batlle, A. (1980) Int. J. Biochem. 12, 717.
- Wider de Xifra, E. & Tigier, H. (1970) FEBS lett. 9, 30.
- Wider de Xifra, E. & Tigier, H. (1971) Enzymology 41, 217.
- Wider de Xifra, E.; Stella, A. & Batlle, A. (1978) Plant Science Lett. 11, 93.
- Woods, J. (1974) Mol. Pharmacol. 10, 389.
- Woods, J. & Murthy, V. (1975) Mol. Pharmacol. 11, 70.
- Wu, W.; Shemin, D.; Richards, K. & Williams, R. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1767.
- Yoneyama, Y.; Ohyama, H.; Sugita, Y. & Yoshikawa, H. (1962) Biochim. Biophys. Acta 62, 261.
- Yoneyama, Y.; Tamsi, A.; Yasuda, T. & Yoshikawa, H. (1965) Biochim. Biophys. Acta 105, 100.
- Yoneyama, Y.; Sawada, M.; Takeshita, M. & Sugita, Y. (1969) Lipids 4, 371.
- Yoshinaga, T. & Sano, S. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4722.
- Yoshikawa, H. & Yoneyama, Y. (1964) en "Iron Metabolism" (Ed. F. Gross), vol. 24. Springer-Verlag. Berlin.
- Zaman, Z.; Abbond, M. & Akhtar, M. (1972) J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1263.

CAPITULO III

PORFOBILINOGENASA

	Página
III.1. Introducción	39
III.2. Propiedades generales	40
III.3. Estudios cinéticos	53
III.4. Mecanismo de acción de la PBG-asa	55
III.4.1. Existencia de intermediarios polipirrólicos	55
III.4.2. Intermediarios tetrapirrólicos y mecanismo de acción	61
III.5. Estudios genéticos	84
III.6. Referencias	85

III. PORFOBILINOGENASA

III.1. INTRODUCCION

Lockwood y Rimington (1957) designaron con el nombre de porfobilinogenasa (PBG-asa) al complejo enzimático que cataliza una etapa muy particular dentro del camino biosintético del hemo la ciclización de cuatro moléculas de PBG para dar, a través de una reacción única de reordenamiento, el uroporfirinógeno III o Urogen III (Figura III.1.).

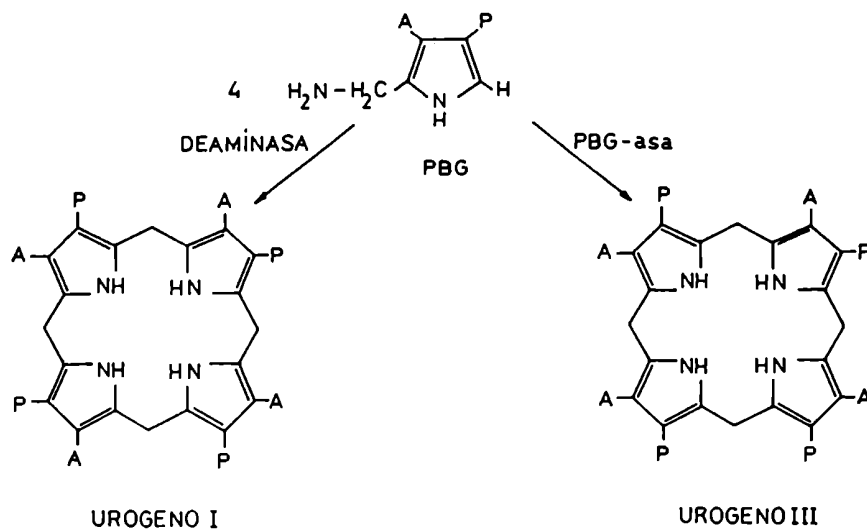


FIGURA III.1.: Formación de uroporfirinógenos I y III.

La PBG-asa está constituida por dos proteínas, la uroporfirinógeno I sintetasa (URO-S), hidroximetilbilano sintetasa, PBG deaminasa o simplemente deaminasa y la uroporfirinógeno III cosintetasa (URO-CoS) o isomerasa.

Para la formación del urogen III, intermediario fisiológico en la biosíntesis de hemo, es imprescindible la acción conjunta de ambas enzimas. En ausencia de isomerasa, la deaminasa cataliza la condensación repetida cabeza-cola de cuatro moléculas de PBG, con eliminación de amoníaco y formación del tipo isomérico I del Urogen.

Aún no se conoce con certeza el modo de acción de la

isomerasa, se sabe que la enzima aislada es incapaz de consumir PBG o de catalizar la conversión de un isómero en el otro; sin embargo, como resultado de la acción conjunta de ambas enzimas, se modifica la orientación de uno de los núcleos pirrólicos del macrociclo, sintetizándose Urogen III. Aparentemente, la isomerasa no afecta la velocidad ni la estequiometría de la reacción pero su concentración determina la relación Urogen III:Urogen I. Así cuando se encuentra en exceso, se forma exclusivamente Urogen III, mientras que en su ausencia se biosintetiza Urogen I; finalmente, a concentraciones intermedias se producen mezclas de Urogen III y I, siendo el porcentaje del isómero III proporcional a la cantidad de isomerasa.

Hasta el presente se propusieron numerosos esquemas para explicar el mecanismo de acción de la PBG-asa y la mayoría de estas hipótesis se basan en la existencia de intermediarios poli pirrólicos de cadena abierta. Más adelante nos ocuparemos en forma más detallada de este tema. Por el momento, es importante resaltar que el estudio del mecanismo de la reacción, así como todo lo relacionado con el normal funcionamiento de este complejo proteico nos permitirá explicar la naturaleza de los defectos enzimáticos primarios responsables del desarrollo de algunas de las enfermedades denominadas porfirias.

III.2. PROPIEDADES GENERALES

Tanto la PBG-asa como sus componentes se han estudiado extensamente en tejidos de origen animal, vegetal y bacteriano. Según lo observado, en la mayoría de ellos, la PBG-asa es una enzima citoplasmática. Sin embargo, existen evidencias que avalan la hipótesis de que podría hallarse en la fracción particulada, asociada a membranas (Falk y Dresel, 1960; Carell y Kahn, 1964).

En nuestro laboratorio, se detectó actividad de PBG-asa en ambas fracciones de *Euglena gracilis*, crecida bajo diferentes condiciones de iluminación (Rossetti y col., 1986).

Para la purificación de la PBG-asa se emplean diversos métodos físico-químicos combinados de maneras más o menos complejas, dependiendo del tejido en estudio.

Teniendo en cuenta que la isomerasa, a diferencia de la deaminasa, es una proteína termolábil, frecuentemente se separan

por calentamiento a temperaturas y tiempos variables (Llambías y Batlle, 1971 a; Batlle y Rossetti, 1977; Rossetti, 1978 y referencias allí citadas). No obstante, ambos componentes enzimáticos se lograron separar sin destrucción o inactivación de uno de ellos, mediante la utilización de técnicas tales como diálisis contra agua destilada, fraccionamiento con resinas de intercambio iónico y tratamiento con fuerza iónica elevada (Levin y Coleman, 1967; Stevens y col., 1968; Sancovich y col., 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a, b).

En algunos casos, las enzimas así purificadas son electroforéticamente homogéneas a diferentes pH's, aunque este comportamiento depende de la fuente utilizada.

Mediante el empleo de procedimientos convencionales (filtración por geles, electroforesis en geles de poliacrilamida y centrifugación en gradiente de sacarosa) se determinaron los pesos moleculares (PM's) del complejo y sus componentes. Para la deaminasa, parece existir acuerdo en cuanto a su PM, pues resulta ser de 40.000 ± 4.000 para la enzima proveniente de diversas fuentes (Rossetti y col., 1980 y referencias allí citadas; Williams y col., 1981; Williams, 1984; Fumagalli y col., 1985). No obstante, Frydman y Feinstein (1974) reportaron un PM de 25.000 ± 5.000 en eritrocitos humanos, y Kotler y col., (1987) informaron un valor de 74.000 ± 7.400 en *Rp. palustris*. Por otro lado, Rossetti y col. (1980) encontraron que la deaminasa de *E. gracilis* existiría como un dímero de PM 40.000, en equilibrio con su monómero de PM 20.000, siendo la especie más importante la de mayor peso molecular. Sin embargo, cabe destacar que Correa García y col. (1988) detectaron una forma de PM 30.000 para el constituyente principal de la enzima de *S. cerevisiae*.

Por el contrario, el comportamiento de la isomerasa frente a geles de dextrano y agarosa varía con la fuerza iónica, sugiriéndose entonces que según las condiciones experimentales empleadas se produciría una asociación de unidades de la enzima formando agregados moleculares diferentes, con la consecuente diversidad de PM's, desde 5.000 - 6.000 a 280.000 (Rossetti y col., 1980 y referencias allí mencionadas).

En base a lo expuesto anteriormente, parecería lógico que los PM's estimados para la PBG-asa sean distintos, pues podrían existir fenómenos de asociación-disociación entre un número variable de unidades de los componentes individuales del

complejo enzimático (Rossetti y col., 1980, 1986; Fumagalli y col., 1982). En base a evidencias experimentales, nuestro laboratorio postuló que la estructura funcional mínima de la PBG-asa en *Euglena gracilis* e hígado de cerdo sería un dímero de PM 50.000, cuyos protómeros de PM 25.000 estarían formados por dos unidades proteicas diferentes, en relación 1 mol de deaminasa (PM 20.000):1 mol de isomerasa (PM 5.000) (Rossetti y col., 1980, 1986; Fumagalli y col., 1982).

En cuanto al pH se reportaron actividades máximas de PBG-asa y de deaminasa a pH's entre 7,2 y 8,2 según la fuente enzimática empleada. Para ambas enzimas se observaron curvas de actividad semejantes, según se midiese el PBG consumido o las uroporfirinas formadas. No obstante, en callos de soya (Llambías y Batlle, 1971 b) y en *Euglena gracilis* (Rossetti y col., 1987) dicho comportamiento fue diferente, ya que se detectó un único pico para ambas enzimas cuando se midió el producto formado y dos picos bien definidos cuando se consideró el sustrato consumido. Resultados similares se obtuvieron cuando se estudió el efecto del pH sobre la actividad de la PBG-asa de *Rp. palustris* (Juknat de Geralnik, 1983). Estos últimos hallazgos serían consistentes con la idea de que el consumo de sustrato ocurre probablemente en dos etapas con pH's óptimos diferentes.

Es importante destacar aquí las observaciones de Cornford (1964) quien trabajando con un sistema más o menos crudo, capaz de producir una mezcla de porfirinas de tipo I y III, encontró que la cantidad y concentración relativas de estos isómeros estaban influenciadas significativamente por el cambio de pH y la composición salina. Resultados en cierto modo análogos se obtuvieron empleando preparaciones parcialmente purificadas de PBG-asa de hígado bovino (Sancovich, Ferramola y Batlle, resultados no publicados).

En consecuencia, estos datos estarían indicando que tanto el pH como la fuerza iónica del medio son factores muy importantes en lo que se refiere al modo de acción de la PBG-asa y que podrían afectar, muy probablemente, la formación de un complejo activo deaminasa-isomerasa (Sancovich y col., 1969 a).

Por otra parte, Williams y col. (1981) empleando la deaminasa de *Euglena gracilis*, estudiaron la dependencia de V_{max} y V_{max}/K_m con el pH. La V_{max} exhibió una típica curva de campana

indicando la presencia de dos grupos ionizables importantes para la catálisis, cuyos pK's resultaron 6,1 y 8,9. El gráfico de V_{max}/K_m vs. pH mostró una única ionización (pK = 8,2), la cual influiría en la unión del sustrato a la enzima. Williams (1984) obtuvo resultados similares estudiando la forma termoestable de la enzima de bazo de rata.

Ya se mencionó anteriormente la estabilidad frente al calentamiento de la deaminasa. En la mayoría de los casos, esta enzima suele preincubarse a 65 °C durante 15 a 30 minutos con el objeto de purificarla, pues de esta manera se destruye la isomerasa. No obstante, a temperaturas superiores sufre una rápida y considerable inactivación. Además, las preparaciones más purificadas de esta enzima son más susceptibles a tratamientos a temperaturas elevadas.

La isomerasa, en cambio, es una proteína termolábil y pierde un 80 % de su actividad cuando se la preincuba a 65-70 °C durante 20 - 30 minutos, en presencia de deaminasa. Cuando esta enzima se calienta sola, su inactivación es mucho más significativa y rápida; lo cual sugiere que en el complejo PBG-asa, la isomerasa debe estar asociada a la deaminasa de tal forma que esta última le confiere cierta protección. También se observó, que el agregado de sulfato de amonio 0,01 M o PBG 0,04 mM protege en un 80 - 100 % a la isomerasa de la inactivación térmica (Llambías y Batlle, 1971 a, b; Sancovich y col., 1976).

Por otra parte, cuando preparaciones parcialmente purificadas de PBG-asa se someten a un precalentamiento a 60 °C durante 30 minutos, no sólo tiene lugar la inactivación de la isomerasa sino que también se observa un incremento paralelo en la síntesis de porfirinas de tipo I (Cornford, 1964; Sancovich y col., 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Rossetti, 1978).

En cuanto a la atmósfera de incubación, es de hacer notar que en muchos casos tanto la PBG-asa como la deaminasa son igualmente activas en presencia o ausencia de oxígeno (Bogorad, 1958 a, b; Lockwood y Benson, 1960; Sancovich y col., 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a; Fumagalli y col., 1982; Juknat de Geralnik, 1983; Araujo y col., 1987). Sin embargo, en callos de soya (Llambías y Batlle, 1970 a; Stella y col., 1971) y en Euglena gracilis (Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti, 1978) la formación de uroporfirinógenos es mucho menor en aerobiosis, si bien

el consumo de sustrato no se modifica sensiblemente con el cambio de atmósfera. Estos resultados llevaron a postular que la presencia de oxígeno no prevendría la síntesis de intermediarios pero sí podría oxidarlos, impidiendo que puedan ser utilizados por las enzimas para la formación de producto.

Respecto al consumo de PBG, el cual no parece modificarse en presencia de oxígeno, se llegó a sugerir que en aerobiosis el sustrato sería consumido por otra vía que no condujera a la formación de porfirinas, como por ejemplo, a través de una pirrol-oxigenasa (Frydman y col., 1972 a).

El grupo de Frydman observó que deaminasas de distintas fuentes eran fotosensibles (Frydman y Frydman, 1970; Frydman y Feinstein, 1974) e inhibidas por una pirrol-oxigenasa, oxidasa de función mixta que inactiva las enzimas que contienen residuos triptofano, en presencia de ditionito. Frydman y Frydman (1973) sugirieron por lo tanto que este aminoácido podría estar involucrado en el sitio activo de la enzima.

Por otro lado, en nuestro laboratorio se logró unir covalentemente la PBG-asa de hígado bovino a Sepharosa (Rossetti y col., 1976). La enzima insolubilizada sintetizaba Urogen III, al igual que en la enzima soluble, la relación isómero III:isómero I dependía del tratamiento previo de la enzima, de las condiciones de incubación y de las cantidades relativas de isomerasa y deaminasa activas.

Finalmente, señalaremos que la deaminasa proveniente de una gran variedad de fuentes se comporta electroforéticamente como una proteína homogénea (Levin y Coleman, 1967; Stevens y col., 1968; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Jordan y Shemin, 1973; Frydman y Feinstein, 1974; Higuchi y Bogorad, 1975; Russell y Pollack, 1978). No obstante, Miyagi y col. (1979) presentaron evidencias que demuestran la presencia de isoenzimas en eritrocitos humanos. Un año más tarde, el mismo grupo de trabajo reportó la existencia de seis bandas electroforéticas en preparaciones de deaminasa purificada, proveniente de eritrocitos humanos y bovinos (Miyagi y col., 1980). Estos autores clasificaron las isoenzimas en grupos de baja estabilidad-alta actividad y alta estabilidad-baja actividad, postulando que todas estas isoenzimas serían capaces de catalizar la reacción, pero que cada una de ellas tendría especificidad distinta por los diferentes órganos

(hígado, riñón, médula ósea), predominando en uno de ellos.

Hasta el momento en todos los sistemas estudiados, la PBG-asa y la deaminasa se comportaron como enzimas sulfhidrúlicas (Sancovich y col., 1969 a, 1976; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Frydman y Feinstein, 1974; Russell y Rockwell, 1980). Si bien aún no se conoce el mecanismo mediante el cual estos grupos sulfhidrilos participan en la reacción, se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas sugiere que los grupos sulfhidrilos podrían ser indispensables para la formación de un complejo enzimático activo, favoreciendo el ordenamiento o disposición estructural necesario para la expresión de su actividad; también se supuso que los sulfhidrilos podrían estabilizar el complejo enzima-sustrato (Llambías y Batlle, 1971 a, b). Finalmente, dado que los inhibidores típicos de grupos tioles afectan en mayor grado la formación de porfirinas que el consumo de PBG, se propuso que es tos grupos estarían involucrados en la etapa de ciclización.

Asimismo, se encontraron evidencias de que los grupos ditiolos serían esenciales para la actividad enzimática. Por otra parte, varios reactivos clivantes de uniones disulfuro inhiben parcialmente la reacción (Llambías y Batlle, 1971 a, Sancovich y col., 1976). El cianuro, afecta el tipo isomérico de las porfirinas formadas (80 % de Uro I) pero no la cantidad total de las mismas. Lockwood y Benson (1960) y más tarde, Llambías y Batlle (1971 a) sugirieron que el cianuro podría interferir o competir de algún modo con el sustrato de la isomerasa o bloquear la acción de esta enzima.

Refiriéndonos al efecto de las sales de sodio y magnesio, es necesario señalar que las mismas poseen una acción estimulante sobre la PBG-asa y deaminasa de algunas fuentes (Llambías y Batlle, 1971 b; Sancovich y col., 1976; Clement y col., 1982), probablemente debida a la participación de estos iones en algún fenómeno de asociación-disociación de la proteína, la cual alcanzaría de esta manera el ordenamiento estructural necesario para la expresión de su máxima actividad. Este efecto activante no se observó con la PBG-asa de *Euglena gracilis* (Rossetti y col., 1987), *Rp. palustris* (Juknat, 1983) y *S. cerevisiae* (Araujo y col., 1988).

Estudiando el efecto del amonio y la hidroxilamina sobre la deaminasa, Carpenter y Scott, 1961 y Bogorad (1962, 1963) y posteriormente, Pluscec y Bogorad (1970, 1972) encontraron que

ambos reactivos inhibían tanto el consumo de PBG como la formación de producto, siendo éste último mucho más significativo. Posteriormente, Sancovich y col. (1969 a, b), Llambías y Batlle (1971 a, b), Frydman y Feinstein (1974) y Rossetti (1978) observaron el mismo efecto inhibitorio sobre la PBG-asa y la deaminasa de otras fuentes. Sancovich y col. (1969 a) y Stella y col. (1971) propusieron que el amonio se uniría a la isomerasa en el sitio activo correspondiente al PBG o a un intermediario polipirrólico, sin descartar la posibilidad de que los iones amonio podrían disociar el complejo PBG-asa o modificar la interacción de sus componentes, que sería necesaria para su actividad.

Más recientemente, Juknat (1983) realizando estudios cinéticos sobre la PBG-asa de *Rp. palustris* en presencia de iones amonio, encontró que éstos disminuyen la formación de porfirinas a concentraciones crecientes de inhibidor y sustrato, modificando sólo ligeramente la cinética de la reacción. En cuanto al tipo isomérico, observó que al aumentar la concentración de PBG se favorece la formación de Uro III a expensas del isómero I, lo cual sugeriría una interacción competitiva entre el PBG y el amonio sobre el sitio activo de la isomerasa. En este caso, el amonio no afectó el consumo de PBG.

En algunos tejidos, la adenina, ATP y ADP inhibieron la PBG-asa sin modificar el tipo isomérico (Llambías y Batlle, 1971 a); sin embargo, con enzimas de otras fuentes, los efectos de estos compuestos fueron algo diferentes y más complejos (Llambías y Batlle, 1971 b; Sancovich y col., 1976). En 1976, Sancovich y col. encontraron que un gran número de alquilaminas, ciertas concentraciones de ATP y ADP, en presencia o ausencia de sales, inhibían a estas enzimas; a otras concentraciones, el ATP y el ADP, producían activación. En base a estos resultados se postuló que los compuestos básicos tendrían efectos separados sobre la deaminasa y la isomerasa y que existiría una competencia entre las enzimas y las bases por sus sustratos o intermediarios. Además, como el efecto inhibitorio es más significativo sobre la formación de porfirinas que sobre el consumo de sustrato, se propuso que la etapa de ciclización sería la más sensible al efecto de estos inhibidores.

Estos mismos autores (Sancovich y col., 1976; Llambías y Batlle, 1971 a, b) observaron que la deaminasa se inhibía en presencia de algunos ácidos dicarboxílicos y de 2-metoxinitrotro

pona, reactivo que modifica química y específicamente a los grupos amino libres de las proteínas. Ellos propusieron que los ácidos dicarboxílicos competirían con el PBG por algunos grupos de la enzima cargados positivamente (restos ϵ -amino de la lisina o restos guanidina de la arginina). Esta hipótesis concuerda con los trabajos de Bogorad (1958 a) quien demostró que el formaldehído inhibía la deaminasa uniéndose a los residuos lisina de la proteína.

Por otra parte, la misma enzima de germen de trigo y de eritrocitos humanos, es inhibida por monopirroles sintéticos análogos al PBG, que poseen una posición α libre, una cadena ácido propiónico en posición β y un grupo metilo o aminometilo en la posición α (Frydman y Frydman, 1970; Frydman y Feinstein, 1974).

Russell y Rockwell (1980) encontraron que la deaminasa de germen de trigo era inhibida por el ácido opsopirrol dicarboxílico (OPD). Observaron además, que este compuesto protegía la enzima de la acción inhibitoria ejercida por la N-etilmaleimida (NEMI) y por un derivado mercurial del PBG (PBG-Hg). Estas evidencias sugerirían la existencia de uno o más grupos sulfhidrilos en el sitio activo de la enzima. En presencia de PBG, el efecto inhibitorio de los compuestos mercuriales fue mayor; se postuló entonces, que el PBG podría provocar un cambio conformacional cuya consecuencia sería la exposición de los grupos tioles, o también podría activar los reactivos mercuriales originando un compuesto más reactivo.

Se estudió además, el efecto de la butanodiona sobre la actividad de la deaminasa de germen de trigo (Pollack y Russell, 1978); encontrándose que esta dicetona inhibe considerablemente a la enzima y que este efecto puede revertirse por el agregado de PBG. En ciertas condiciones, la butanodiona inactiva ciertas enzimas, ya que bloquea los grupos guanidino de los residuos arginina, que juegan un papel importante en el sitio activo de estas enzimas, que se caracterizan por poseer sustratos que contienen en su estructura grupos carboxilatos y fosfatos. Posiblemente la deaminasa pertenezca también a esta familia de enzimas, lo cual permite sugerir que uno o más residuos arginina serían necesarios para la unión del PBG.

En último término, nos referiremos a la isomerasa, cuyas propiedades se estudiaron casi totalmente en forma indirecta, ya que para poder medir su actividad se incubó en presencia de

deaminasa. Varios autores incubaron isomerasa purificada de numerosas fuentes con PBG y en algunos casos, con ciertos intermedios polipirrólicos de callos de soya, *Euglena gracilis* y *Rp. palustris*, obteniéndose uroporfirinógenos (Llambías y Batlle, 1970 a; Rossetti y Batlle, 1977; Juknat, 1983). En base a estos hallazgos se postuló que los posibles sustratos para la isomerasa serían el PBG y algún polipirrilmetano unido a la proteína, formado durante la reacción.

Sin embargo, en el año 1979, casi simultáneamente dos grupos diferentes informaron acerca de la existencia de dos intermedios de reacción, sustratos de la isomerasa. El grupo de Jordan y Scott presentó evidencias obtenidas mediante estudios espectroscópicos, indicando que la transformación enzimática del PBG en Urogen I y III ocurría a través de un intermediario libre al que denominaron preuroporfirinógeno (Burton y col., 1979) (Figura III.2.). Este compuesto sería formado por la deaminasa a partir de PBG, actuando a continuación como sustrato de la isomerasa, para dar lugar al Urogen III (Jordan y col., 1979; Jordan y Berry, 1980).

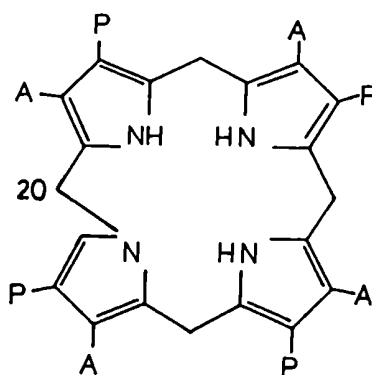


FIGURA III.2.: Preuroporfirinógeno

Por su parte el grupo de Battersby reportó que la síntesis del Urogen III ocurría vía un intermediario que ellos identificaron como hidroximetilbilano (Figura III.3.); en este caso la isomerasa originaría un reordenamiento intramolecular para dar el Urogen III (Battersby y col., 1979 a).

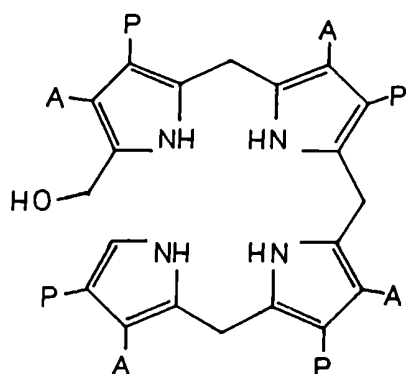


FIGURA III.3.: Hidroxime
tilbilano

Clement y col. (1982) aislaron y purificaron la isomerasa de hígado de rata, estudiando algunas de sus propiedades. Los autores hallaron que manteniendo una relación de unidades de isomerasa:deaminasa igual a 14:1, se aseguraba la formación de un 80 % de Urogen III. Stevens y col. (1968) habían propuesto para extractos crudos de eritrocitos humanos, una relación 10:1. Por su parte, Rossetti y Batlle (1977) también se refirieron a este exceso de isomerasa concluyendo que, en condiciones fisiológicas, se aseguraría así la síntesis exclusiva de Urogen III.

Estudios efectuados sobre la actividad de la PBG-asa y sus componentes de hígado de rata, en presencia de iones metálicos, revelaron que la isomerasa sería más sensible que la deaminasa a la inhibición ejercida por metales, tales como cadmio (II) zinc (II) y cobre (II) en concentraciones de 10 μM (Clement y col., 1982). Probablemente estos iones interfieren en la formación del complejo activo deaminasa, isomerasa. Alternativamente, la isomerasa podría poseer grupos tioles más expuestos que los de la deaminasa. Debido a que la inhibición por metales es no-competitiva y se revierte en presencia de compuestos tiólicicos, es probable que dichos grupos no se encuentren en el sitio activo sino que estén involucrados en el mantenimiento de una conformación adecuada.

En 1985, Hart y Battersby purificaron isomerasa de *Euglena gracilis* y demostraron que se trataba de una enzima

monomérica de PM 38.500 ó 31.000, según se lo determine empleando estudios de filtración en geles o electroforesis respectivamente. Los mismos autores realizando estudios cinéticos, en los cuales utilizaron hidroximetilbilano (HMB) como sustrato, determinaron el Km que resultó estar en el rango de 12-40 μM , así como también comprobaron que el Urogen III actuaba como inhibidor de la isomerasa. Finalmente, en investigaciones tendientes a establecer los residuos aminoacídicos esenciales para la actividad enzimática, observaron que los residuos arginina son fundamentales, los lisina también pueden serlo, mientras que los histidina, cisteína y tirosina no.

Por otro lado, Sancovich y col. (1969 a) aislaron a partir de preparaciones parcialmente purificadas de PBG-asa de hígado bovino, un factor ultrafiltrable que estimulaba la formación de Urogen a partir de PBG. Más tarde, Tephly (1975) identificó una molécula de bajo PM aislada del citosol de hígado de rata, que poseía un efecto protector sobre la inhibición por plomo de la deaminasa de eritrocitos de ave. Luego, Piper y van Lier (1977) sugirieron que este factor protector podría ser una molécula del tipo de los derivados del pteroilpoliglutamato, de manera que podría lograrse un efecto análogo empleando como sustituto de esa molécula protectora, el ácido fólico.

Casi simultáneamente, Juknat de Geralnik y col. (1981) detectaron la presencia de un factor en *Euglena gracilis* que regulaba la síntesis enzimática de porfirinógenos y describieron un modelo para explicar el mecanismo de acción de dicho factor (Figura III.4.), postulando la existencia de varias formas enzimáticas de la PBG-asa. Asimismo, analizando paralelamente el efecto del factor y el ácido fólico, se encontró que el primero puede ser reemplazado por el segundo en una concentración 10^{-7} M, pues produce el mismo grado de activación, si bien ninguno de estos compuestos modifica la actividad de la enzima proveniente de la fracción particulada (Pellet) ya sea unida a membrana o solubilizada.

En 1980, Wider de Xifra y col. demostraron la recuperación clínica y bioquímica de pacientes con porfiria aguda intermitente, luego de un corto tratamiento con ácido fólico. Estas observaciones, junto con los hallazgos de disminución del metabolismo de drogas, concentración de citocromo P₄₅₀ y contenido de hemo en ratas con deficiencia de folato (Parke, 1978) y cerdos de

Guinea (Clement y col., 1981) sugirieron que la regulación de la conversión de PBG en uroporfirinógenos podría estar mediada por una molécula de folato. Las últimas evidencias experimentales obtenidas acerca de este tema (Kohashi y col., 1984) indican que un factor pteroilpoliglutamato reducido está asociado a la isomerasa de hígado de rata pudiendo éste funcionar como una coenzima para la biosíntesis de Urogen III.

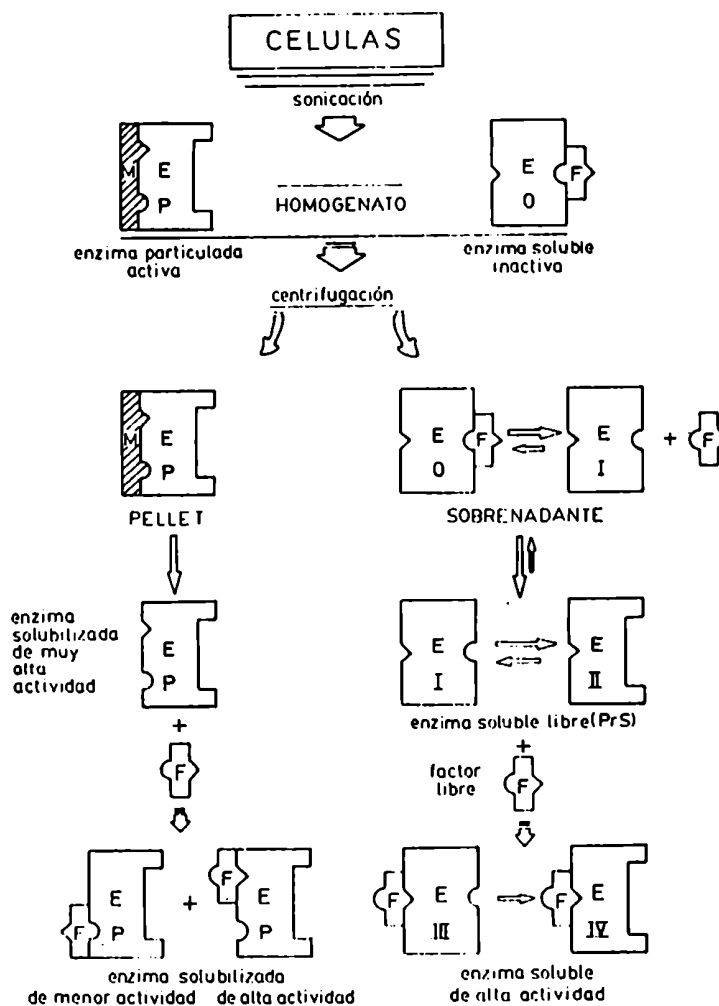


FIGURA III,4.: Mecanismo propuesto para la liberación y activación de un factor de bajo PM, regulador de la síntesis enzimática de porfirinógenos en *Euglena gracilis*.

No obstante, en 1985 Hart y Battersby trabajando con isomerasa de *Euglena gracilis* no hallaron evidencia alguna que corroborara la presencia de algún metal, cofactor o derivado folato

asociado a la enzima.

Por otra parte, Christenson y col. (1986) estudiaron el efecto *in vitro* e *in vivo* de la sulfamerazina sobre la actividad de la Urogen III cosintetasa de hígado de rata. Sus hallazgos sugieren que la sulfamerazina interfiere en la interacción de la URO-S y cosintetasa, inhibiendo a esta última enzima en su capacidad de dirigir la formación de Uro III. La adición de ácido fólico *in vitro* revierte la inhibición. Así las sulfonamidas, que poseen una estructura p-aminobenzoil en común con el ácido fólico, podrían interferir con un sitio regulatorio para la coenzima folato sobre la URO-S, siendo la coenzima folato provista por la cosintetasa, de acuerdo con los hallazgos de Kohashi y col. (1984).

Más recientemente, Juknat y col. (1988 a) aislaron y purificaron el compuesto capaz de regular la actividad de la PBG-asa de *E. gracilis*. Estudios de espectroscopía de fluorescencia, IR y RMN indicaron que la estructura de este factor correspondía a la de una 6-biopterina (Juknat y col., 1988 b).

Además, Kotler y col. (1988 a) encontraron que la sulfamerazina es capaz de inhibir *in vivo* la actividad de la URO-S de sangre de rata, produciendo además, efectos activantes e inhibitorios sobre la biosíntesis de porfirinas en homogenatos de cerebro, dependiendo estos últimos del tiempo de incubación y del período transcurrido luego de administrada la droga. En concordancia con los hallazgos de Christenson y col. (1986), Kotler y col. (1988 b) encontraron que el ácido fólico es capaz de revertir totalmente *in vitro* la inhibición producida por la sulfamerazina sobre la deaminasa de sangre de rata.

A su vez, Smythie y Williams (1988) purificaron la deaminasa de eritrocitos humanos informando para la misma una cinética hiperbólica, una curva de tiempo para la síntesis de uroporfirinógenos que presenta una fase lag y un peso molecular de 44.000 determinado por filtración en geles de Sephadex G-100. La enzima resultó ser monomérica y los diversos folatos ensayados no tuvieron efecto sobre la actividad de la misma.

III.3. ESTUDIOS CINETICOS

Varios investigadores realizaron estudios profundos y extensivos sobre el comportamiento cinético de la PBG-asa y deaminasa purificadas de hígado bovino (Sancovich y col., 1969 a, b), eritrocitos de ave (Llambías y col., 1971 c) y callos de soya (Llambías y Batlle, 1970 b, c).

Estudiando la cinética de las enzimas de hígado bovino bajo condiciones experimentales muy variadas, se observó un comportamiento homotrópico positivo, con gráficos de inversas no lineales y un n de Hill tendiendo a 2, para el caso de la PBG-asa. No obstante, cuando esta enzima se calentó o dializó contra agua destilada o cuando se agregaban iones amonio a la mezcla de reacción, desaparecía este fenómeno de interacción homotrópica, al mismo tiempo que se incrementaba la afinidad por el PBG y se formaba Urogen I en lugar del isómero III. De acuerdo a esto, vemos que la deaminasa de hígado bovino presenta una clásica cinética de Michaelis-Menten tanto en ausencia como en presencia de iones amonio, los cuales la inhiben no competitivamente, mientras que sobre la isomerasa actúan competitivamente.

Posteriormente, se estudió el efecto de una gran variedad de compuestos sobre el comportamiento de las enzimas de hígado bovino (Sancovich y col., 1969 a, b; 1976) y los resultados obtenidos, al igual que los anteriores, muestran a la PBG-asa como una proteína alostérica, que posee por lo menos dos sitios de unión para su sustrato por molécula de enzima activa.

Llambías y Batlle (1971 c) purificaron la PBG-asa y la deaminasa de eritrocitos de ave y estudiaron su cinética, comprobando que en presencia y ausencia de diferentes iones, las enzimas exhibían un comportamiento similar al de sus análogas de hígado bovino. Así, la cinética de la PBG-asa es sigmoidea con un n de Hill cercano a 2, en ausencia de iones modificadores. Sin embargo, en presencia de iones o cuando la isomerasa estaba ausente, nuevamente desaparecían los efectos cooperativos homotrópicos. Este hecho nuevamente ubicó a la PBG-asa como una enzima alostérica.

Finalmente, extensos estudios cinéticos llevados a cabo con PBG-asa y deaminasa de callos de soya, revelaron un comportamiento bastante diferente al de las enzimas provenientes de otras fuentes (Llambías y Batlle, 1970 b, c). Las curvas de saturación

para ambas proteínas, en presencia y en ausencia de iones amonio, eran bifásicas con gráficos de dobles recíprocas no lineales y bimodales, lo cual permitió calcular dos valores de K_m .

Estos hallazgos sugirieron la existencia de dos reacciones, una de las cuales se saturaría a bajas concentraciones de PBG, en tanto que la otra, lo haría a concentraciones más altas.

Asimismo, se determinó que los iones amonio actuaban inhibiendo competitivamente la primer etapa de la reacción catalizada por la PBG-asa.

Esta desviación del típico comportamiento michaeliano, o aún de uno sigmoideo, se apreció también al calcular los valores de R_s y los n de Hill para ambas enzimas; en algunos casos, los valores de R_s fueron mayores que 81 y los n de Hill menores de 1, lo cual indicó una cooperatividad homotrópica negativa.

Frydman y Feinstein (1974) y Anderson y Desnick (1980) investigando la deaminasa de eritrocitos humanos, obtuvieron una curva de saturación michaeliana, aunque no analizaron el gráfico de dobles recíprocas ni ningún otro tipo de gráfico cinético para corroborar dicho comportamiento.

Williams y col. (1981) efectuaron estudios de velocidades iniciales empleando deaminasa de *Euglena gracilis* y midieron la velocidad de formación de Urogen I a tres valores de pH y en un amplio rango de concentraciones de sustrato. En todos los casos, el gráfico de $(PBG)/v$ vs. (PBG) resultó lineal.

Más recientemente, Hart y col. (1986) purificaron deaminasa de *Escherichia coli* hasta homogeneidad, e investigaron posteriormente las variaciones de los valores de K_m aparente y V_{max} aparente en función del pH. Del análisis de los gráficos de $\log V_{max}$ y $\log(V_{max}/K_m)$ vs pH se obtuvieron dos valores de pK^E ($pK_1^E = 6,70$ y $pK_2^E = 7,98$) y dos de pK^{ES} ($pK_1^{ES} = 7,07$ y $pK_2^{ES} = 7,92$), los cuales fueron diferentes de los hallados por Williams y col. (1981) para la deaminasa de *Euglena gracilis*. Finalmente, los autores señalan que la unión del PBG a la enzima virtualmente no afecta el pK_2 , mientras que el pK_1 se incrementa en 0,37 unidades de pH, reflejando presumiblemente un cambio conformacional inducido por el sustrato.

Por otro lado, Rossetti y col. (1987) analizando el comportamiento cinético de la PBG-asa de *E. gracilis*, encontraron que, midiendo la velocidad en función de las porfirinas formadas,

las curvas de saturación seguían una cinética michaeliana, con gráficos de dobles recíprocas lineales y n de Hill 1, en concordancia con lo observado para la PBG-asa de cepas salvajes y mutantes de *S. cerevisiae* (Araujo y col., 1988) pero en desacuerdo con lo hallado para la enzima de hígado bovino (Sancovich y col., 1969 b), callos de soya (Llambías y Batlle, 1970 b), eritrocitos de ave (Llambías y Batlle, 1970 c) y *Rp. palustris* (Juknat de Geralnik, 1983).

Sin embargo, cuando la actividad se midió en términos del PBG consumido, se obtuvo una respuesta sigmoidea, gráficos de Lineweaver-Burk no lineales y un n de Hill igual a 2, indicando la existencia de por lo menos dos sitios de unión interactivos para el PBG, por molécula de enzima.

III.4. MECANISMO DE ACCION DE LA PBG-asa

III.4.1. Existencia de intermediarios polipirrólicos

Sin lugar a dudas la pieza clave en la elucidación del mecanismo de acción de la PBG-asa, es la identificación del sustrato de la isomerasa.

En 1963, Bogorad postuló sobre bases teóricas, que esta enzima actuaba sobre un intermediario de estructura desconocida, producto de la acción de la deaminasa sobre el PBG. Sin embargo, hasta 1970 no se lograron detectar estos intermediarios. La primera evidencia experimental de su existencia provino de los estudios con callos de soya (Llambías y Batlle, 1970 a, 1971 b; Stella y col., 1971), en los cuales se encontró que en condiciones normales de incubación por acción de la PBG-asa y de la deaminasa sobre el PBG, se originaban intermediarios polipirrólicos distintos, denominados "P" y "D" respectivamente. La incubación de "P" con PBG y PBG-asa producía solamente Urogen III mientras que "D" junto con PBG y deaminasa formaba 100 % de Urogen I.

De los resultados obtenidos estudiando la cinética de las enzimas de callos de soya (Llambías y Batlle, 1970 a) y *Euglena gracilis* (Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti y col., 1977) se propuso que la conversión del PBG en Urogen I ó III ocurriría en dos etapas: durante la primera se sintetizaría un intermediario polipirrólico y en la segunda se formaría el producto final.

Tanto en *E. gracilis* como en callos de soya existía un lag pronunciado para la formación de uroporfirinógenos, luego del cual la síntesis aumentaba en forma lineal con el tiempo. Sin embargo, dicha fase lag no se observó al medir el consumo de sustrato. Asimismo, se encontró que la cantidad de porfirinas formadas se hallaba muy por debajo de la relación estequiométrica. Este exceso en el consumo de sustrato, corroborado en varias oportunidades, indicaría que debería formarse algún intermediario de naturaleza polipirrólica (Llambías y Batlle, 1970 a, 1971 b; Stella y col., 1971; Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti, 1978).

Llambías y Batlle (1971 a) observaron que la fase lag era más corta o aún podía desaparecer cuando dicho intermediario se encontraba presente en la mezcla de reacción desde el comienzo de la incubación. Esto sugeriría que su ausencia o su lenta formación serían la causa de la demora en la aparición de los uroporfirinógenos.

A partir de estos hallazgos, surgieron otros estudios de acumulación y aislamiento de di y tetrapirroles, pero obtenidos incubando PBG más deaminasa en presencia de inhibidores tales como amonio, hidroxilamina y metoxiamina (Pluscec y Bogorad, 1970; Radmer y Bogorad, 1972; Davies y Neuberger, 1973). En estas investigaciones se observó que altas concentraciones de hidroxilamina y amonio inhibían la síntesis de uroporfirinógenos en mayor grado que el consumo de PBG. Teniendo en cuenta este efecto, Pluscec y Bogorad (1970) aislaron e identificaron un dipirrimetano no isomerizado (DPM-I, Figura III.5.A), de una mezcla de reacción de deaminasa de espinaca con PBG, en presencia de hidroxilamina. Estos mismos autores y Frydman y col. (1971), empleando DPM-I sintetizado químicamente, demostraron que este dipirrol no actuaba como sustrato o intermediario en la síntesis del Urogen III pero sí se comportaba como intermediario en la formación enzimática del Urogen I.

En contraste, el grupo de Battersby (Battersby y col., 1977 a, b, c) empleando preparaciones enzimáticas de PBG-asa de *Euglena gracilis* demostró claramente que el DPM-I era convertido eficientemente en Urogen III a través de un bilano tetrapirrólico lineal no isomerizado (Figura III.6.). Recién después de la formación de este intermediario tetrapirrólico tendría lugar el mecanismo por el cual ocurriría la inversión de un anillo pirrólico.

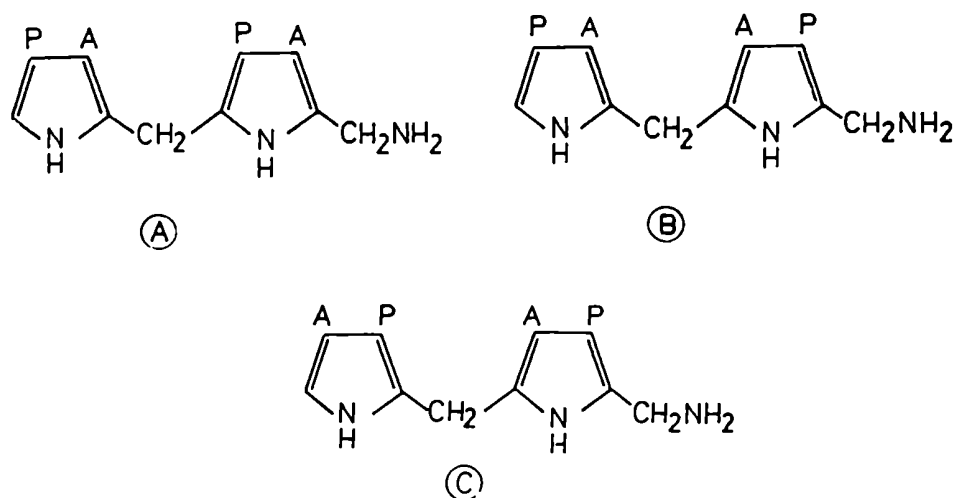


FIGURA III.5.: Dipirrilmetanos: (A) DPM-I, (B) DPM-III y (C) DPM-II

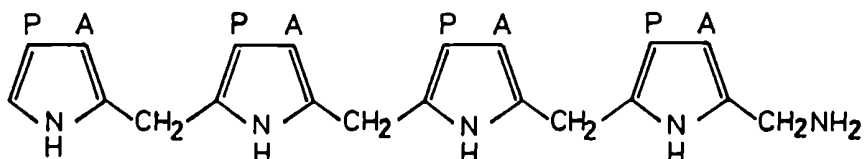


FIGURA III.6.: Tetrapirrilmetano I

Radmer y Bogorad (1972) aislaron e identificaron de mezclas de incubación de deaminasa de espinaca y PBG en presencia de amonio, un tetrapirrilmetano (TPM-I, Figura III.6.) que formaba Urogen I no enzimáticamente en una reacción de primer orden. Anteriormente, Bogorad (1963) había propuesto que el intermediario polipirrólico en la biosíntesis de Urogen III sería un compuesto del tipo TPM-I. No obstante, la observación adicional de que la deaminasa no aceleraba la conversión del tetrapirrol en Urogen I, nos hace pensar que un compuesto de esa naturaleza podría ser un intermediario normal en la síntesis de Urogen III, siempre y

cuando no se encuentre libre en solución sino formando parte de un complejo transitorio con las dos enzimas.

Battersby y col. (1977 a) demostraron que la incubación de grandes cantidades de TPM-I sintético (4 mg) con PBG-asa producía un 70 % de Urogen III y 30 % del isómero I formado por ciclización no enzimática. Sin embargo, Dauner y col. (1976) incubando TPM-I, obtenido por un método diferente, con PBG-asa de *P. shermanii* obtuvieron una mezcla de uroporfirinógenos en la cual había un 14 - 18 % del tipo III y un 82 - 86 % del tipo I. Estos datos podrían conciliarse con los del grupo de Battersby si atribuimos las diferencias en rendimiento y porcentajes relativos a la cantidad de bilano y a la actividad de las preparaciones de PBG-asa empleadas, que eran muy superiores en los ensayos de Battersby.

Valasinas y col. (1978) sintetizaron DPM-I empleando un nuevo método y encontraron que este último no era sustrato de la deaminasa, de la isomerasa ni de la PBG-asa; todo esto apoyó la hipótesis de que la inversión del anillo de PBG debe ocurrir en una etapa temprana de la reacción.

Por su parte, Frydman y col. (1972 b) demostraron que el dipirrilmetano III (DPM-III, Figura III.5.B) se incorporaba es pecíficamente en el Urogen III en presencia de PBG y por acción de la PBG-asa. Dado que en ausencia de PBG no existe incorporación, los autores eliminaron la posibilidad de una condensación de pares de moléculas de DPM-III. Sin embargo, la incorporación de DPM-III es baja y del mismo orden que la hallada para el DPM-I con deaminasa, en contraste con la significativa incorporación de DPM-I en Urogen III obtenida por Battersby y col. (1977 c).

Battersby y col. (1973 a) aseguraron que el DPM-I se incorporaba en la Proto IX tanto en hemolizados de eritrocitos de pato como en extractos crudos de *Euglena gracilis*. No obstante, Frydman y Frydman (1975 a) justificaron esos resultados considerando que podrían deberse a la acción de las enzimas decarboxilantes sobre el Urogen IV, formado por dimerización química del DPM-I. Según estos autores, el Urogen IV formaría luego una proto porfirina isomérica no fácilmente distinguible de la Proto IX.

Sin embargo, Battersby y col. (1973 b) estudiando la incorporación de (2, 11-¹³C)PBG en Proto IX, en las mismas fuentes ya mencionadas, demostraron que era el anillo D el que sufría

un reordenamiento intramolecular, en tanto que las otras tres unidades se incorporaban intactas en los anillos restantes (A, B, C).

Por otra parte, analizando la especificidad del sistema enzimático, Frydman y col. (1978 a) sintetizaron mediante un nuevo método DPM-I, DPM-III y DPM-II (Figura III.5.C) confirmando la incorporación del DPM-I y DPM-III en Urogen I y Urogen III respectivamente. El DPM-II no sólo no se incorporaba a ninguno de los isómeros sino que ejercía un efecto inhibitorio sobre el sistema deaminasa-isomerasa.

En este punto, notamos que existe un acuerdo entre los distintos grupos de trabajo respecto a que un aminometilidipirrilmetano estaría involucrado en la conversión del PBG en Urogen III, si bien hay discrepancias respecto al momento en el cual ocurriría la isomerización. Según Battersby y col. (1977 a, b, c) ésta tendría lugar luego de la formación de un bilano lineal no isomerizado, mientras que según las propuestas de Llambías y Batlle (1970 a, 1971 b); Frydman y Frydman (1975 a) y Batlle y Rossetti (1977), la isomerización ocurriría en la etapa de condensación de las dos primeras moléculas del sustrato.

Con el objeto de definir esta situación, Scott y col. (1976) desarrollaron un nuevo enfoque para el estudio de esta reacción, el cual aparentemente podría proveer la manera de distinguir entre ambos mecanismos (Figura III.7. y Figura III.8.). La Figura III.7. muestra la hipótesis de Mathewson y Corwin (1961), en ella se esquematiza la vía del bilano simétrico. Por otra parte, la Figura III.8. presenta la teoría de Rimington-Johnson, la cual estaría de acuerdo con las hipótesis de Cookson y Riminton (1954) y Bullock y col. (1958); en ella se observan dos caminos: el (A) involucra una reacción intramolecular de tipo estrictamente químico, a través de un reordenamiento concertado $7 \rightarrow 6$, no excluyéndose la posibilidad de un reordenamiento intramolecular enzimático $7 \rightarrow 8 \rightarrow 6$ (camino (B)). En 1976, Scott y col. incubaron un (^{14}C)DPM simétrico que carecía del grupo amino metilo terminal (DPM-8, Figura III.9.), con PBG-asa purificada de espinaca, extractos libres de células de *Clostridium tetanomorphum* y células enteras de *P. shermanii*. En todos los casos observaron que el DPM-8 se incorporaba en el Urogen III y no en el I. Estos autores propusieron entonces, que este compuesto se debería intercambiar con una molécula igual, lo cual revelaría que durante la

reacción el resto aminometilo se separaría totalmente del DPM formado en el primer paso de la reacción. Esto estaría probando que la síntesis del isómero III está controlada por la formación del DPM-III y apoyaría la hipótesis de que la inversión del anillo ocurre en una etapa temprana, mediante un mecanismo de transferencia del grupo aminometilo (Figura III.10.).

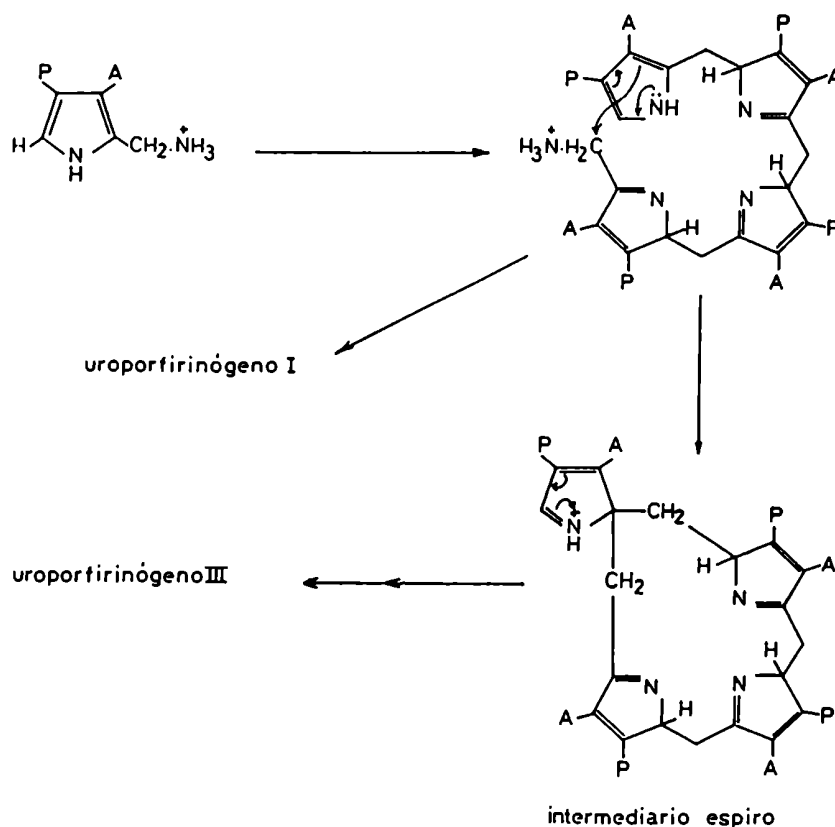


FIGURA III.7.: Hipótesis de Corwin para la formación del uroporfirinógeno III ó I.

Frydman y col. (1974) demostraron que el 2-aminometiltripirrano sintético (tripirrano I, Figura III.11.A) no era sustrato de la isomerasa ya fuera agregado sólo o bien en presencia de PBG en la mezcla de reacción. Tampoco fue sustrato de la deaminasa en ausencia de PBG y aún inhibió la síntesis enzimática del Urogen III. Notaron además que este compuesto se incorporaba pobremente en el Urogen I, lo cual sugirió que no era sustrato

de la deaminasa, aunque podría actuar como intermediario en la formación de Urogen I. Los mismos autores investigaron además la interacción de los tripirranos II, III y IV (Figura 11.B, C y D, respectivamente) con las enzimas involucradas en la biosíntesis de uroporfirinógenos (Frydman y col., 1978 b). El tripirrano III no funcionó como sustrato de la isomerasa, de la deaminasa, ni aún de la PBG-asa, con o sin PBG presente. Al igual que el tripirrano I no se incorporó en Urogen I e inhibió la síntesis del Urogen III. Cuando el tripirrano II se incubó en presencia de PBG y de cada una de las 3 enzimas se observó que no era sustrato de ninguna de ellas y que ejercía un efecto inhibitorio mayor sobre la formación de Urogen III que sobre la de Urogen I. Este último efecto también fue observado con el tripirrano IV, el cual no se comportó como sustrato ni como intermediario en la biosíntesis de Urogen III como tampoco en la de Urogen I. Sin embargo, Franck y col. (1977 a, b) encontraron que el tripirrano IV se incorporaba significativamente en el hemo formado por hemolizados de sangre de pato. El tripirrano V (Figura III.12.) también se incorporaba aunque en menor proporción que el anterior.

Del análisis de todos los estudios presentados hasta el momento surgiría que el sistema enzimático sería capaz de emplear no sólo uno sino varios intermediarios para la biosíntesis del hemo, si bien cada uno de ellos funciona con una eficiencia diferente. Este hecho sumado a que en diferentes casos se utilizaron muy pequeñas cantidades de di y oligopirroles, a la variedad de las fuentes enzimáticas empleadas y más aún de sus respectivas actividades enzimáticas, así como también a la notable tendencia de los oligopirroles a sufrir una condensación no enzimática, explicarían de algún modo los hallazgos contradictorios encontrados con los precursores análogos (Scott y col., 1976; Battersby y col., 1977 a, b, c; Franck y col., 1977 a, b; Frydman y col., 1978 a, b).

III.4.2. Intermediarios tetrapirrólicos y mecanismo de acción

Hasta este momento hemos recopilado datos referentes a la detección, aislamiento, identificación y síntesis química y bioquímica de intermediarios polipirrólicos de longitud variable, algunos de los cuales llevan a la formación del isómero III ó I, según el caso. Discutiremos ahora el mecanismo de biosíntesis de

uroporfirinógenos, el cual debe necesariamente tener en cuenta todos los aportes experimentales obtenidos. Paralelamente, mencionaremos las evidencias que permitieron identificar al verdadero intermediario tetrapirrólico involucrado, el que posibilitó la postulación de un mecanismo de acción para la PBG-asa.

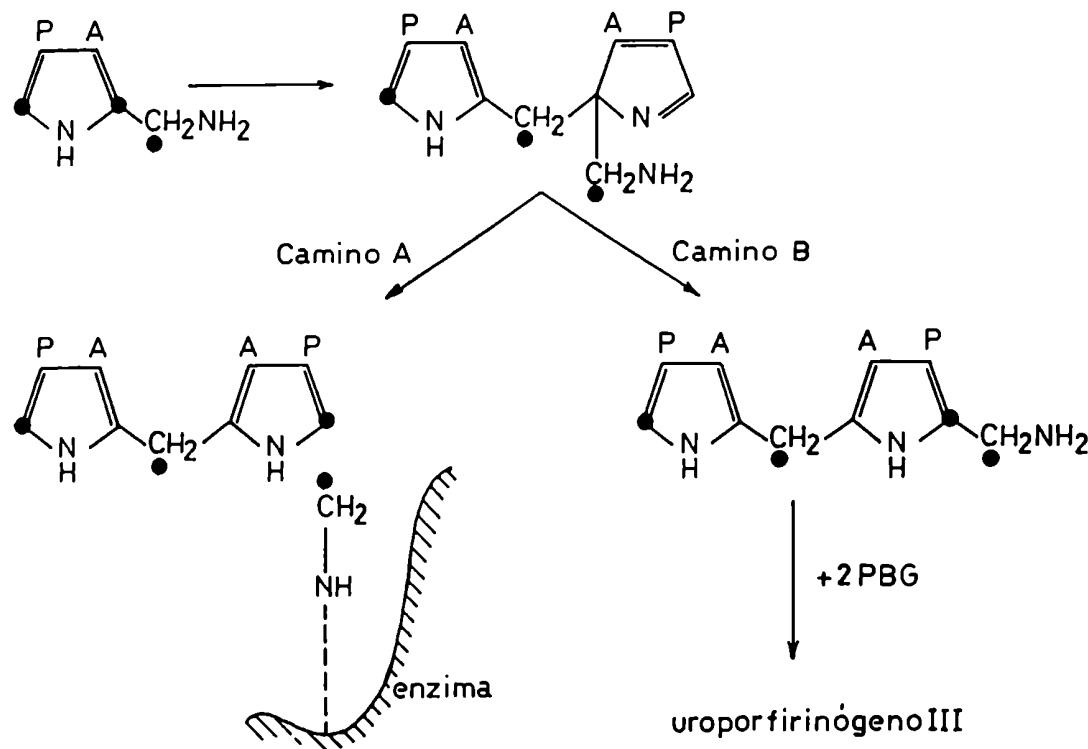


FIGURA III.8.: Hipótesis de Rimington-Johnson

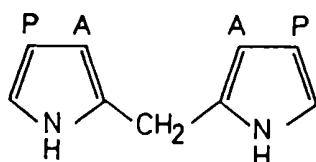


FIGURA III.9.: Dipirrometano
"sin cabeza"

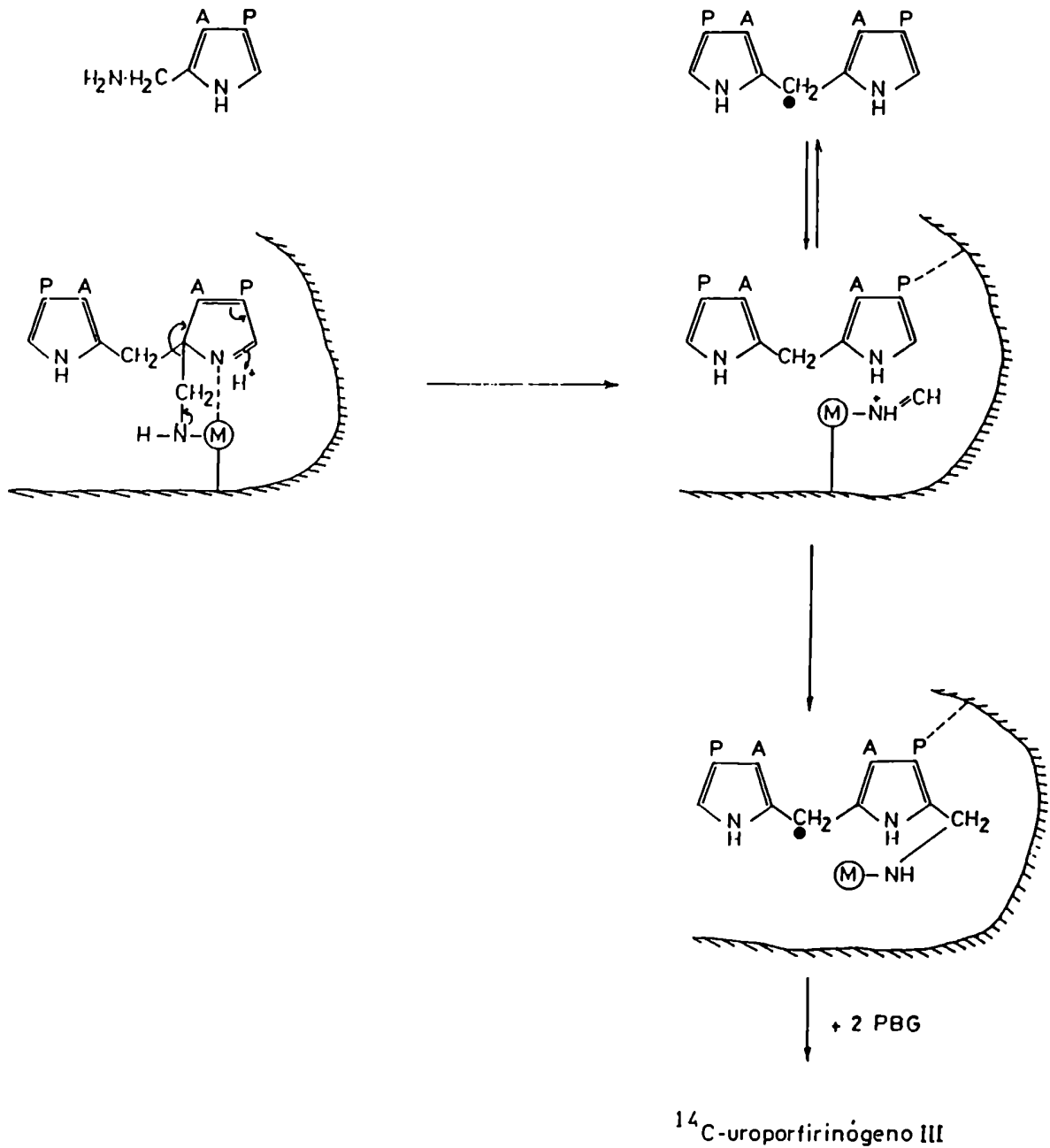


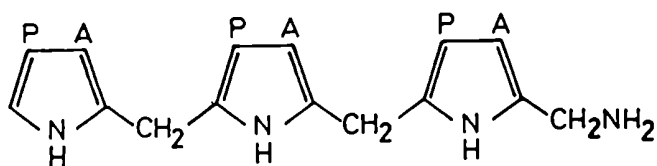
FIGURA III.10.: Hipótesis de Scott

Hasta 1971 no se había logrado demostrar si la isomerasa era una enzima que actuaba modificando o complementando la acción de la deaminasa, o si cumplía la función de una transferasa. Hasta ese momento la mayoría de los resultados experimentales señalaban que la etapa de isomerización ocurría al comienzo de la

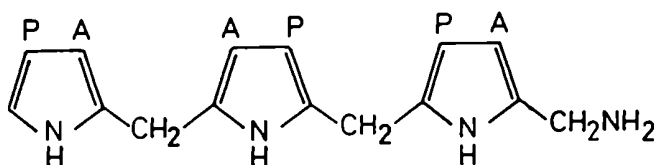
condensación, si bien existían algunas dudas al respecto. A esa altura de las investigaciones, se postuló un esquema de reacción (Figura III.13.) que tenía en cuenta los hechos experimentales ya mencionados (Llambías y Batlle, 1971 b). Los autores propusieron que la primer molécula de PBG se unía a la deaminasa a través de sus dos sustituyentes carboxílicos y su posición α libre. La deaminasa catalizaría luego la formación de un dipirrol con la segunda molécula de PBG, a partir de la cual se originaría un tripirrol lineal que ya tendría la estructura de la serie III, por acción combinada con la isomerasa. Como ya se dijo entonces, sobre la base de resultados preliminares que sugerían que los intermediarios polipirrólicos aislados naturalmente eran tripirranos, la isomerasa funcionaría en una etapa posterior a la formación del dipirrol, pero antes de la inserción de la última molécula de PBG, si bien se consideraba la posibilidad de que la isomerasa actuara en una etapa todavía anterior, es decir, durante la formación del dipirrol (Llambías y Batlle, 1971 a, b).

Posteriormente, Rossetti y Batlle (1977) reportaron un mecanismo modificado que se ajustaba mejor a las evidencias experimentales (Figura III.14.). Este esquema se basaba en que la unión y reacción de las dos primeras moléculas de PBG con PBG-asa o con deaminasa, debería ser diferente, pues no existen intermediarios pirrilmétanos comunes en los Urógenos III y I. Así, la primera molécula de PBG correspondiente al anillo D se uniría al complejo enzimático, posiblemente a la deaminasa, a través de sus sustituyentes β carboxílicos y su posición α libre, y a la isomerasa mediante su grupo α -aminometilo. En presencia de una segunda molécula de PBG, la isomerasa actuaría modificando el sitio de condensación. De esta forma, como resultado de dicha condensación y del reordenamiento de las dos primeras moléculas de PBG, se produciría un dipirrol del tipo PAAP o DPM-III. En ausencia de isomerasa, la condensación sería normal (cabeza-cola), lo que originaría el dipirrilmetano I (DPM-I) o PAPA. Una vez formado el dipirrol ocurriría la inserción de dos moléculas más de PBG, hasta alcanzar la longitud crítica correspondiente a un tetrapirrol, punto en el que se produciría la ciclización. Una vez finalizado el proceso se separarían las enzimas, las cuales volverían a asociarse para iniciar un nuevo ciclo. De acuerdo con este mecanismo, el intermediario tetrapirrólico puede ser isomerizado (PAAPPAPA) o no (PAPAPAPA), según provenga de la acción de la

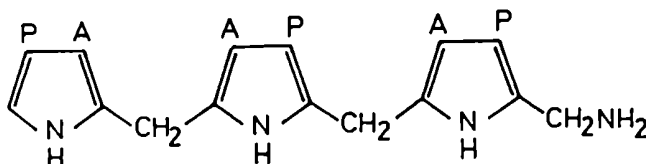
PBG-asa o de la deaminasa respectivamente. Esta última hipótesis no está de acuerdo con la sugerida por los grupos de Scott y Jordan y de Battersby, según veremos más adelante.



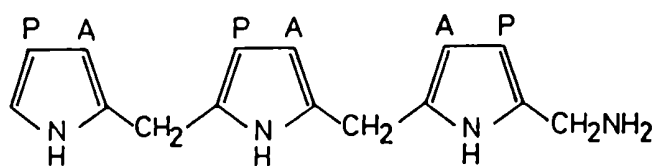
(A)



(B)



(C)



(D)

FIGURA III.11.: Tripirranos: (A) I,
(B) II, (C) III y
(D) IV

El grupo de Battersby, realizando experiencias con ^{13}C , demostró que los 4 anillos pirrólicos del Urogen III se unirían secuencialmente siendo el último (anillo D) el que sufriría un reordenamiento intramolecular (Battersby y col., 1978, 1979 a, b). En

un trabajo simultáneo, este mismo grupo reportó que la deaminasa en presencia de PBG formaba como intermediario un bilano líneal no isomerizado, el cual se liberaría en ausencia de isomerasa como HMB (Figura III.3.; Battersby y col., 1979 c). Este compuesto se transformaría no enzimáticamente en Urogen I, pero en presencia de isomerasa se convertiría rápidamente en Urogen III. Más tarde, Battersby y col. (1980) corroboraron la acción de la isomerasa sobre el HMB, demostrando la isomerización sobre el anillo D y una ciclación rápida para dar Urogen III.

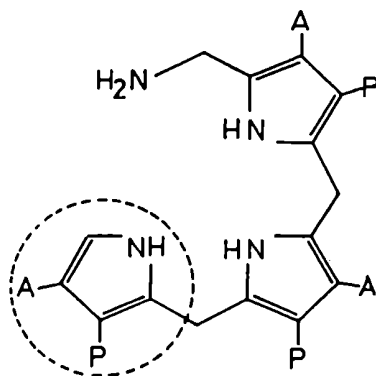


FIGURA III.12.: Tripirano
V

Paralelamente, el grupo de Scott reportó un posible sustrato para la isomerasa. Burton y col. (1979), realizando estudios de espectroscopía RMN de ^{13}C , encontraron que en la biosíntesis del Urogen I ó III existía un intermediario libre, al cual denominaron preuroporfirinógeno. La estructura de este compuesto no se elucidó en ese momento, de manera que los autores sugirieron tres posibles intermediarios (Figura III.15.). En 1979, Jordan y col. demostraron que el preuroporfirinógeno era sustrato de la isomerasa, originando un alto porcentaje de tipo III. En ausencia de isomerasa, este compuesto se ciclaría químicamente formando el Urogen I. Estos mismos autores presentaron evidencias de que la deaminasa y la isomerasa actuaban independiente y secuencialmente en la conversión de PBG en Urogen III.

En el mismo año, Jordan y Seehra (1979) usando cantidades estequiométricas de (^{14}C)PBG y deaminasa parcialmente

purificada de *Rp. spheroides*, seguida de la adición de un exceso de PBG frío, demostraron que el orden de adición de los cuatro anillos pirrólicos era ABCD. Estos resultados eran coincidentes con los reportados por Battersby y col. (1978, 1979 b).

Más tarde, Scott y col. (1980) pusieron fin a las controversias suscitadas entre este grupo y el de Battersby, en lo referente a la estructura química del intermediario tetrapirrólico HMB o preuroporfirinógeno. Los autores, basándose en evidencias bioquímicas y de estudios de RMN, confirmaron para el preuroporfirinógeno la estructura "A" de la Figura III.15.; este intermediario sería el sustrato natural para la isomerasa, a pH 7,8 - 8,5 y 37 °C. A 0 °C podría ocurrir la formación de otras especies como el N-alquilpirrol de la Figura III.15.B, como observaran en sus primeras experiencias Jordan y col. (1979).

Según Scott y col. (1980), es probable que las especies mayoritarias liberadas al medio por la deaminasa, posean la estructura "1" (Figura III.16.). Esta especie puede sufrir posteriormente:

- a) Hidratación a "2" y cierre del anillo, formando Urogen I ("3"), en ausencia de isomerasa.
- b) Adición de nucleófilos catalizada por la deaminasa ("4")
- c) Reordenamiento a Urogen III ("5") catalizado por la isomerasa.

Por su parte, Jordan y Berry (1980) considerando los datos obtenidos por espectroscopía de RMN concluyeron que la estructura más probable para el preuroporfirinógeno sería la de un hidroximetilbilano.

Estos mismos autores, incubaron PBG con deaminasa de *Rp. spheroides*, obteniendo el intermediario preuroporfirinógeno (o hidroximetilbilano), el cual utilizaron como sustrato de la isomerasa proveniente de diversas fuentes: *Rp. spheroides*, levaduras, gérmen de trigo, reticulocitos humanos, eritrocitos de ave y bazo de ratón. En todos los casos, se obtuvo un excelente rendimiento de Urogen III.

Se observó, además, que el intermediario es sumamente inestable a pH fisiológico ($t_{1/2}$ = 4 minutos a 37 °C, pH 8,2-8,5) (Jordan y Berry, 1980; Jordan y col., 1980).

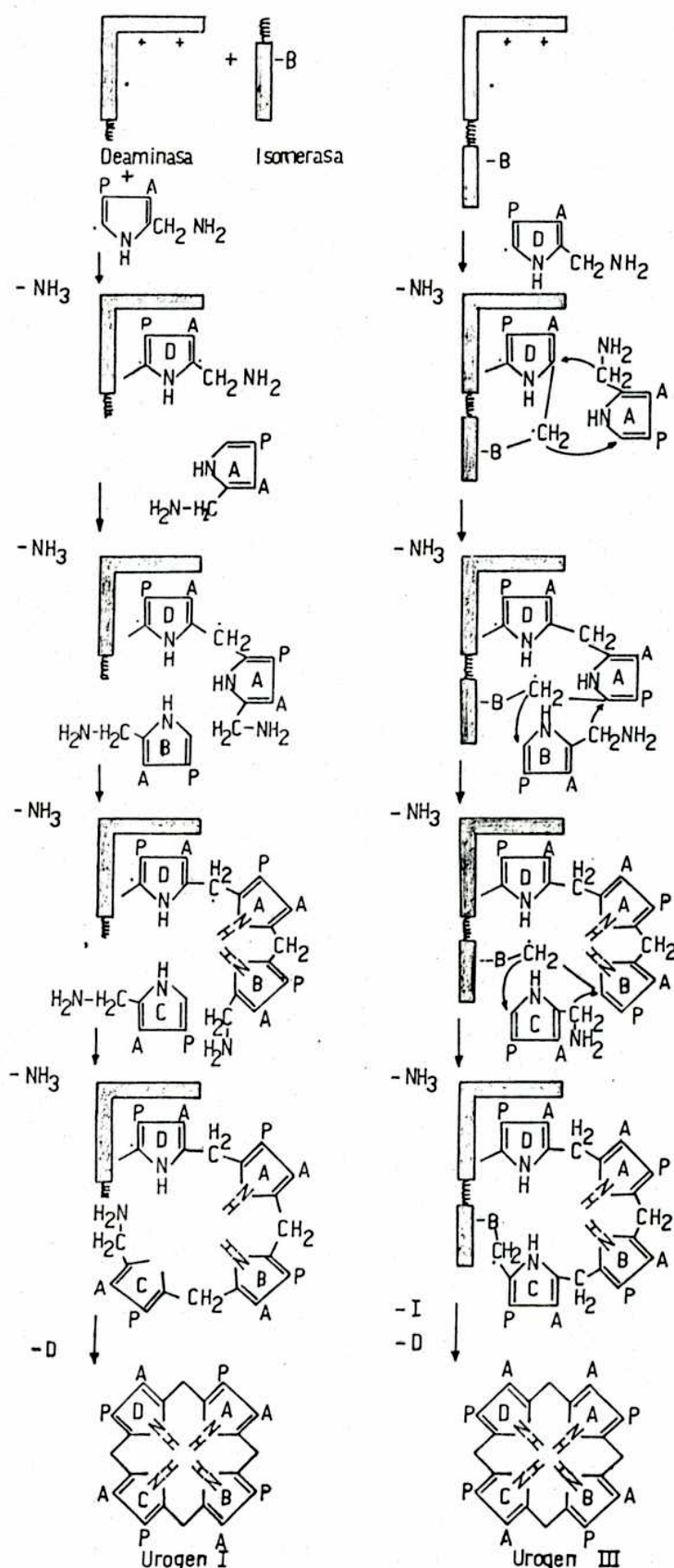



FIGURA III.13.: Esquema propuesto para la formación enzimática de uroporfirinógenos I y III a partir de PBG.

A: cadena lateral acética; P: cadena lateral pro-
piónica; D o : deaminasa; I: isomerasa

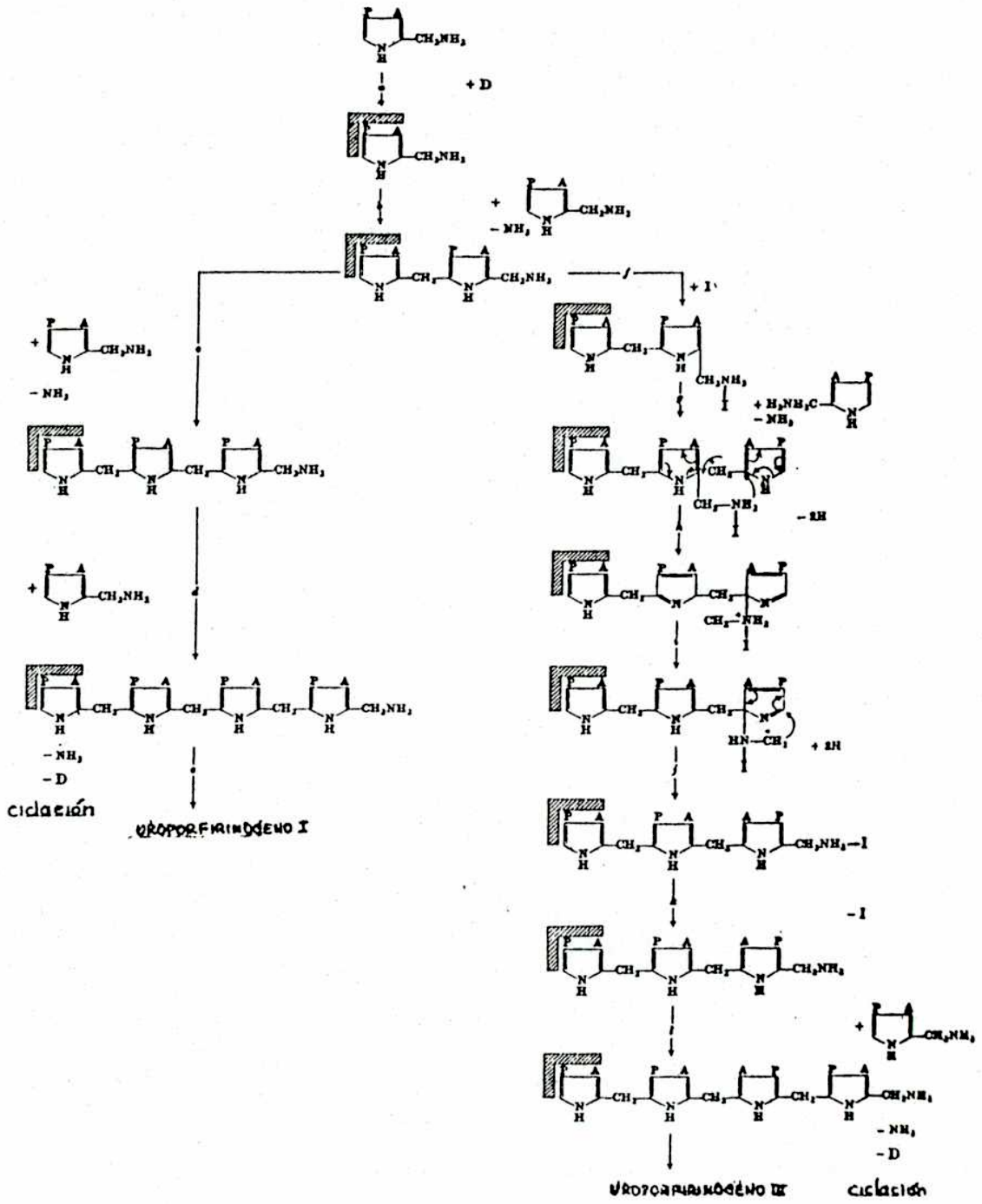


FIGURA III.14.: Mecanismo de acción de la PBG-asa (Batlle y Rossetti, 1977).

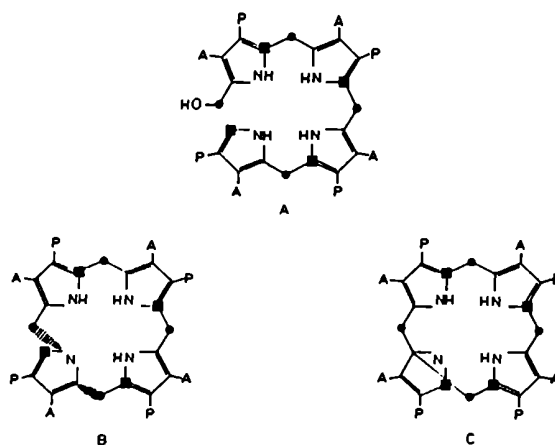


FIGURA III.15.: Intermediarios propuestos por Burton y col. (1979)

En 1981, Jordan y Berry trataron de aislar y caracterizar los complejos enzima-sustrato formados mezclando en forma sumamente rápida deaminasa purificada de *Rp. spheroides* y cantidades crecientes y estequiométricas de (^{14}C)PBG. La electroforesis en gel de poliacrilamida permitió determinar que la deaminasa presentaba una sola banda, en tanto que las muestras provenientes de las mezclas de la enzima más PBG*, poseían movilidad electroforética progresivamente superior y migraban en bandas discretas.

Anderson y Desnick (1980) reportaron la presencia de bandas múltiples cuando incubaron la deaminasa aislada de eritrocitos humanos con PBG en exceso; los autores señalaron que estas bandas corresponderían a los intermediarios enzima-PBG_n.

Berry y Jordan (1981) realizaron importantes observaciones, las cuales permitieron sugerir que estaban en presencia de distintos intermediarios de la reacción catalítica, involucrando uno, dos y tres residuos pirrólicos unidos a la deaminasa. Las bases experimentales que les permitieron a los autores llegar a esta importante conclusión fueron las siguientes:

a) La cantidad de marca (^{14}C) asociada a la proteína era mayor en

las bandas de mayor movilidad electroforética;

- b) a medida que aumentaba la cantidad de PBG que interaccionaba con la enzima, las bandas de proteína de mayor movilidad electroforética se formaban a expensas de las bandas de menor movilidad y de la enzima nativa;
- c) las muestras con proteína marcada, aisladas e incubadas con PBG frío en exceso, mostraron actividad de deaminasa y rindieron Urogen I.

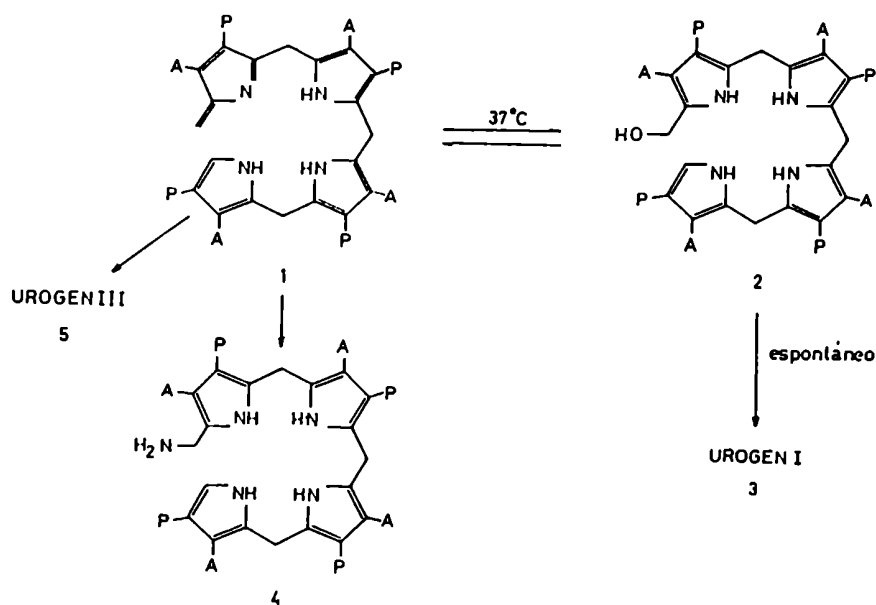


FIGURA III.16.: Especies mayoritarias propuestas por Scott y col. (1980)

Jordan y Berry (1981) establecieron que la interacción de la deaminasa con PBG conducía a la formación de complejos intermediarios covalentes; luego Berry y Jordan (1981) concluyen que sólo el PBG que forma el anillo A en el preuroporfirinógeno está covalentemente unido a la enzima y que las moléculas siguientes sólo contribuyen a la formación del tetrapirrol. Bajo las condiciones de esta experiencia, los autores observaron solamente 3 complejos enzimáticos, presumiblemente debido a que el complejo enzima-tetrapirrol es inestable y se libera rápidamente para formar el preuroporfirinógeno.

Con el objeto de dilucidar el momento en que se producía la inversión del anillo pirrólico, Battersby y col. (1982 a) estudiaron la acción de la PBG-asa de *Euglena gracilis* sobre los aminometilbilanos sintéticos 1-6 (Figura III.17.). Estos aminometilbilanos fueron seleccionados de modo tal que el 1 poseía una estructura no reordenada correspondiente a una condensación cabeza-cola de 4 moléculas de PBG; los bilanos 2 a 5 tenían un anillo invertido y el bilano 6, 3 anillos invertidos. Los datos experimentales demostraron que los bilanos 2 y 6 no eran buenos sustratos; en contraste, se encontró que con el bilano 1 la PBG-asa incrementaba la velocidad de cierre del anillo más eficientemente que para los 3, 4 y 5. Estos hallazgos señalan que el reordenamiento no ocurre al comienzo del proceso de condensación, como afirmaban otros autores (Frydman y col., 1973; Frydman y Frydman, 1975 b; Scott y col., 1976).

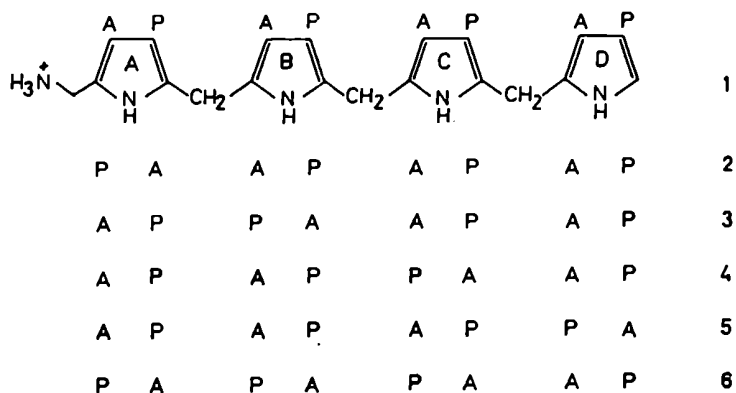


FIGURA III.17.: Aminometilbilanos sintéticos (Battersby y col., 1982 a)

Por otro lado, los resultados obtenidos para los bilanos 4 y 5 mostraron que la inversión puede darse también con sustratos diferentes del natural; si bien, el bilano no reordenado 1 resultó ser el mejor sustrato para la PBG-asa, no sólo por su mayor afinidad de unión al sitio activo (menor Km) sino también por su mayor velocidad de transformación a Urogen III. Sin embargo, este sustrato fue convertido en Urogen III a una velocidad menor que la correspondiente al PBG; debido a ello, los autores sugieren que la estructura exacta del bilano 1 no puede ser la

verdadera estructura del intermediario en el camino biosintético de PBG a Urogen III. Las conclusiones anteriores y las derivadas de los trabajos con los pirrometanos (Battersby y col., 1981 a) son consistentes con el hecho de que el aminometilbilano 1 puede ser aceptado por la enzima y que reacciona para generar el intermediario 7 (Figura III.18.), el cual se formaría sobre la enzima, en condiciones normales, a partir de 4 moléculas de PBG.

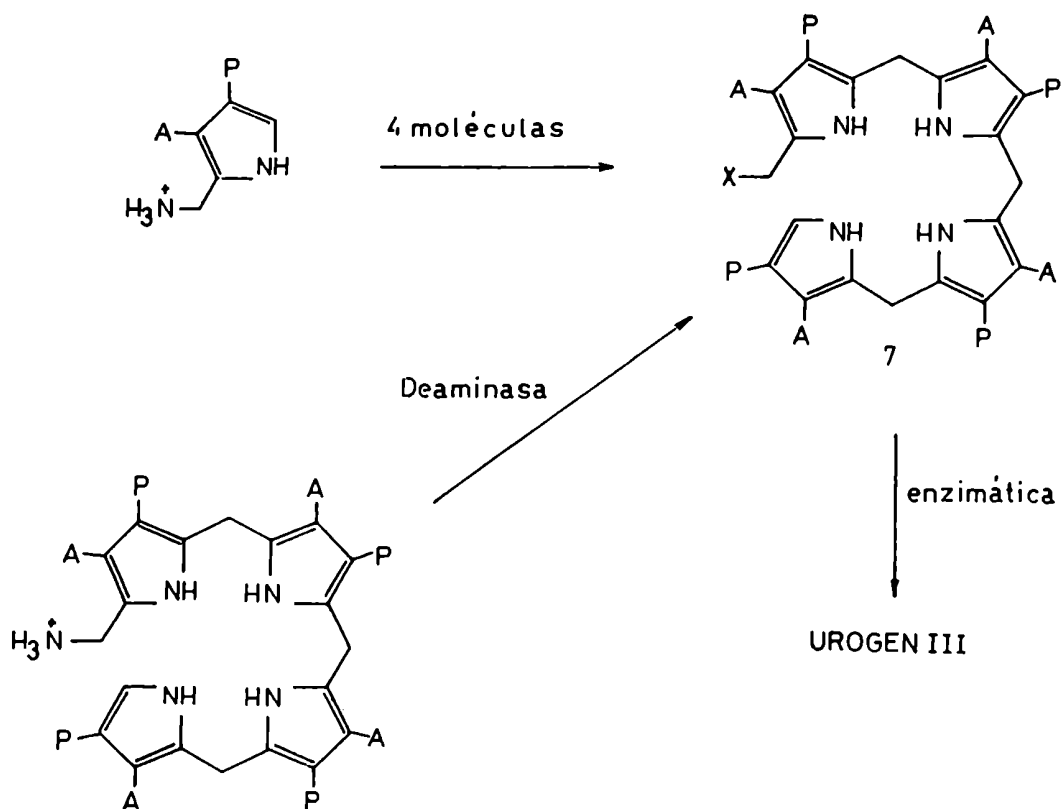


FIGURA III.18.: Intermediario propuesto por Battersby y col. (1982 a)

Por otra parte, Battersby y col. (1982 a) observaron que cuando aumentaba la velocidad enzimática de cierre del anillo del bilano 1 para dar Urogen I, existía un corto lag de tan sólo unos minutos, antes de alcanzar la velocidad máxima. No obstante, ésto no ocurría cuando se analizaba la síntesis del Urogen III. En el

transcurso de ese mismo año, Battersby y col. (1982 b) investigaron la estructura y síntesis del intermediario acumulado durante dicho lag y trataron de clarificar el rol de la deaminasa y de la isomerasa en la biosíntesis del Urogen III. Los resultados revelaron que la deaminasa convertía el PBG en un intermediario inestable el cual se transformaba espontáneamente en Urogen I a pH 8,25. Por su parte, la PBG-asa convertía dicho intermediario en Urogen III. Se supuso además, que la síntesis del isómero III ocurría mediada solamente por la isomerasa, ya que la deaminasa no tenía aparentemente efecto sobre el intermediario.

Simultáneamente, mediante estudios de marcación isotópica y de síntesis a partir de hidroximetilpirrol (hidroxianálogo del PBG), los autores establecieron que su estructura era la de un tetrapirrol no reordenado, el "hidroximetilbilano" (Figura III.19.A). Poco tiempo antes, el grupo de Scott (Burton y col., 1979) había reportado la detección de un intermediario, cuya estructura podría corresponder al compuesto cíclico de la Figura III.19.B. Más tarde, Battersby y col. (1982 b) demostraron que esa estructura era incorrecta y comprobaron además, que el aminometilbilano 1 (Figura III.17.) era convertido por la deaminasa en hidroximetilbilano. De esta manera justificaron el lag que se producía durante la formación del Urogen I a partir del bilano 1. Evidentemente, esta fase lag representaba la formación del HMB hasta que el pool de este producto fuese suficiente como para que su remoción por ciclación a Urogen I balanceara la velocidad de su formación enzimática a partir del aminometilbilano. Además, se encontró que las muestras naturales y sintéticas de HMB se comportaban como sustratos excelentes e idénticos de la isomerasa (libre de deaminasa) produciendo Urogen III.

Resumiendo entonces, acerca del rol de las enzimas deaminasa e isomerasa, los hallazgos de Battersby y col. (1982 b) prueban concluyentemente que: la deaminasa, en ausencia de isomerasa, une cuatro moléculas de PBG mediante una condensación cabeza cola, liberando a la solución el HMB no reordenado, o sea, la deaminasa es una enzima "condensante"; la isomerasa convierte el HMB en Urogen III mediante un reordenamiento intramolecular del anillo D, así la isomerasa se comporta como una enzima "reordenadora y ciclante".

Basándose en todos sus resultados experimentales, el grupo de Battersby (Battersby y col., 1982 b) postuló un nuevo

mecanismo para la biosíntesis del Urogen III (Figura III.20.). Como ya se mencionó, la primera unidad de PBG se encuentra covalentemente unida a la deaminasa a través de un grupo nucleofílico X (Battersby y col., 1979 b; Anderson y Desnick, 1980; Jordan y Berry, 1981). Una vez formado el tetrapirrol lineal "A", la eliminación de X formaría el azafulveno "B" el cual podría reaccionar con agua dando el hidroximetilbilano "C". El agregado de pequeños nucleófilos como amonio, hidroxilamina y metoxiamina pueden competir con el agua por el azafulveno, produciendo los bilanos moderadamente estables "D", "E" y "F", detectados en los trabajos de Bogorad y Neuberger (Radmer y Bogorad, 1972; Davies y Neuberger, 1973). Battersby y col. (1983 a) llevando a cabo experiencias de intercambio y atrapamiento semejantes a las mencionadas, encontraron que el aminometilbilano "D" está en equilibrio con el azafulveno sobre la superficie de la deaminasa, lo cual permite que el bilano sintético "D" actúe como sustrato para el sistema PBG-asa y entre en el camino biosintético normal.

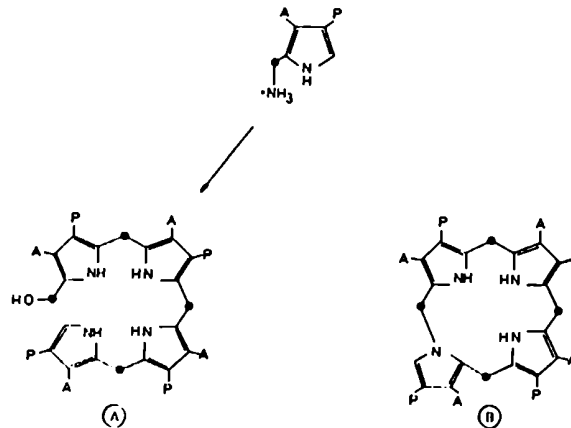


FIGURA III.19.: Posibles intermediarios.

El hidroximetilbilano puede ciclarse químicamente a considerable velocidad para dar el Urogen I, pero su rol natural consiste en actuar como sustrato de la isomerasa para formar Urogen III. Un posible intermediario en el proceso de reordenamiento es el sistema spiro ("G"), similar al considerado en 1961 por Mathewson y Corwin. El proceso de formación de Urogen III podría entonces involucrar fisión y recombinación, si bien también es

posible una serie de corrimientos (1,5) sigmatrópicos alrededor del anillo D.

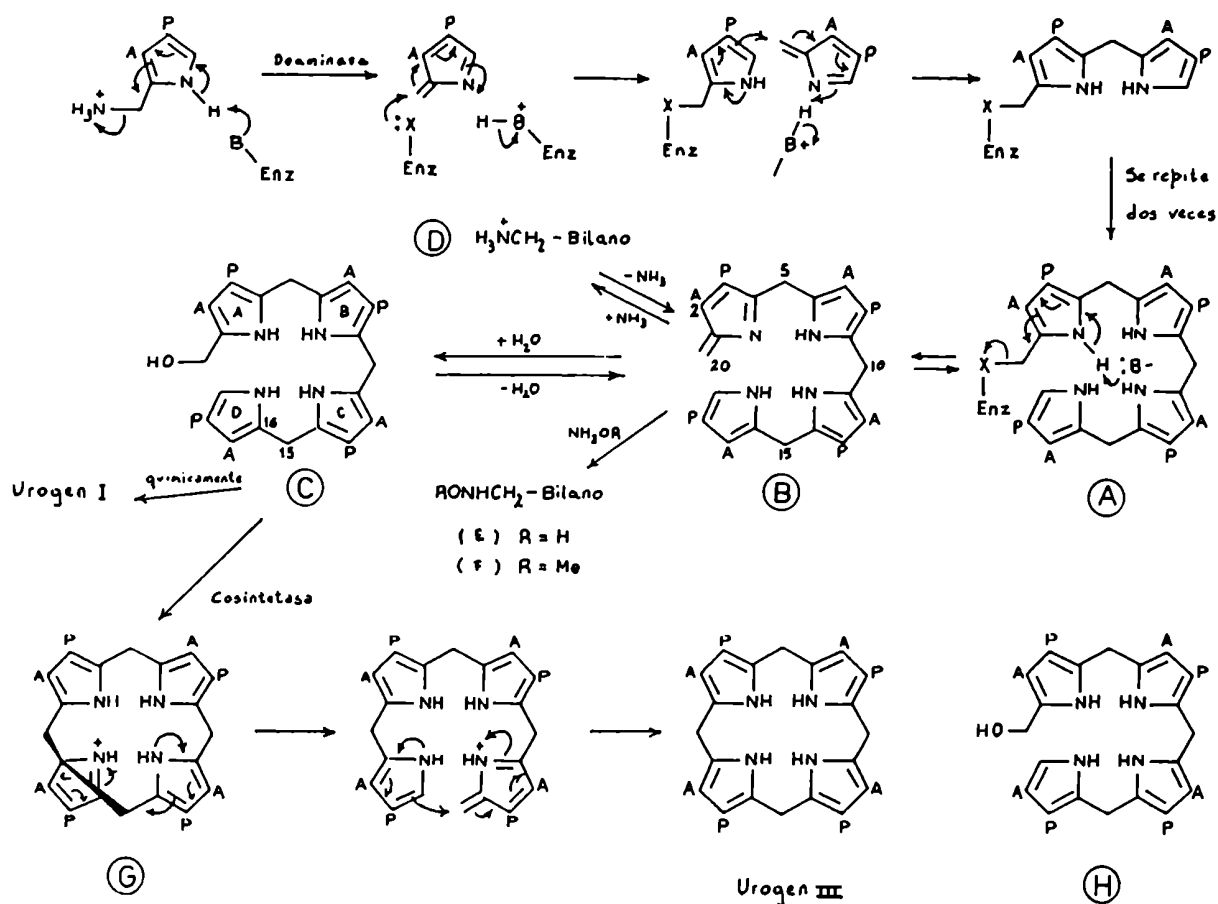


FIGURA III.20.: Mecanismo final de acción de la PBG-asa propuesto por el grupo de Battersby (Battersby y col., 1982 b).

Se podría considerar un segundo mecanismo, el cual involucra la fisión de la unión C-15/C-16 del bilano "C", después de la protonación del C-16, mientras está sobre la superficie de la isomerasa, seguida por la inversión del anillo D sin involucrar ningún intercambio con el medio por parte del fragmento pirrólico separado. La recombinación podría rendir el bilano "H" con el anillo invertido, el cual por ciclación lineal formaría el Urogen III. Sin embargo, el bilano "H" mostró ser un sustrato pobre para la isomerasa, con lo cual se elimina esta posibilidad (Battersby y col., 1981 b).

Por otra parte, el mecanismo spiro, al cual nos

referiremos como mecanismo del metileno externo (imina cuaternaria) (Figura III.21.) parecería ser una alternativa más atractiva. En este caso, durante la secuencia de inversión, el anillo D se encuentra covalentemente unido al grupo metileno externo y finalmente este metileno electrofílico es regenerado cuando se forma el Urogen III.

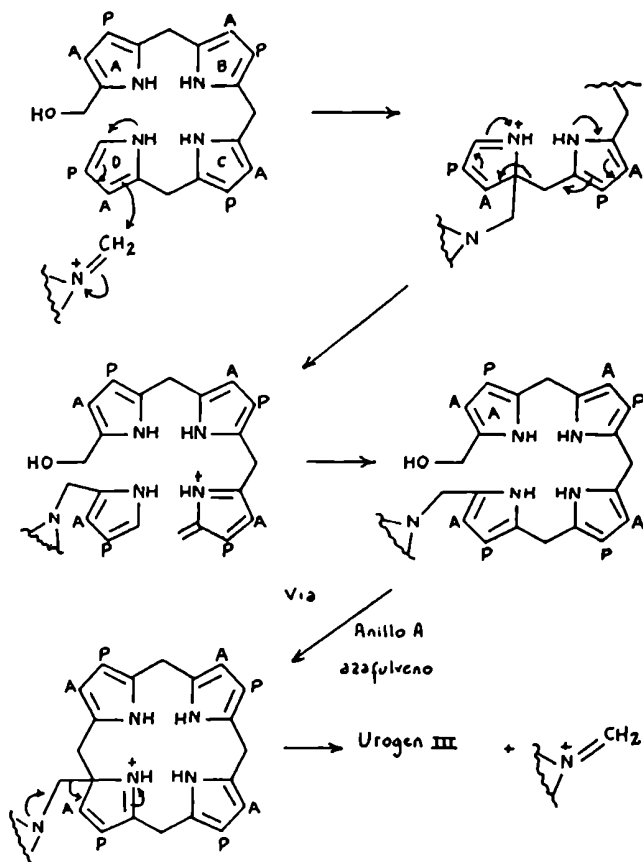


FIGURA III.21.: Mecanismo del metileno externo o spiro.

Más recientemente, Stark y col. (1986) lograron sintetizar lactamas spiro análogas al supuesto intermediario de la transformación del HMB en Urogen III (Figura III.22.). Los autores empleando isomerasa proveniente de *Euglena gracilis* y HMB, en presencia y ausencia de lactamas, realizaron estudios cinéticos en los cuales demostraron que:

a) la forma lactámica "Λ" no afecta la reacción, mientras que la

- "B" es un poderoso inhibidor competitivo (Figura III.22.);
- b) los compuestos "C", "D" y "E", que carecen total o parcialmente del anillo spiro, no inhiben significativamente;
- c) el sustrato (HMB), el inhibidor ("B") y el producto (Urogen III) poseen estructuras radicalmente diferentes.

Estos resultados sugieren indirectamente que el sistema spiro podría ser un intermediario entre el HMB y el Urogen III.

Por otra parte, Battersby y col. (1983 a), trabajando con deaminasa purificada de *Euglena gracilis* demostró que esta enzima une 4 unidades intactas de PBG en la secuencia de formación del Urogen I y que los intermediarios mono, di, tri y tetrapirrólicos están covalentemente unidos a la deaminasa, antes de la liberación de HMB. Observaron además, que la síntesis de este bilano se iniciaba con el anillo A y finalizaba con el D, incorporándose cada una de las moléculas de PBG en el tetrapirrol, a la misma velocidad. Los autores detectaron un intermediario muy reactivo, más aún que el HMB, cuya estructura se identificó con la del tetrapirrol lineal azafulveno.

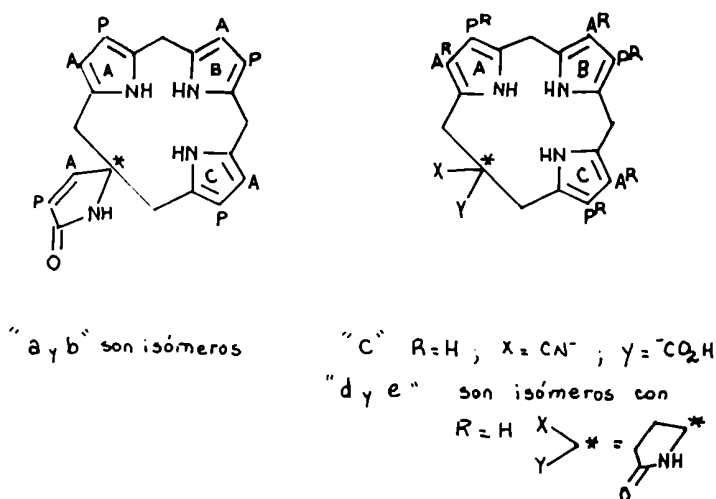


FIGURA III.22.: Lactamas spiro sintéticas (Stark y col., 1986).

Battersby y col. (1983 b) realizaron estudios cinéticos sobre la interacción entre la deaminasa y el hidroximetilbilano y llegaron a demostrar que esta enzima es inhibida por su propio producto. Esta inhibición, medida en función del consumo de sustrato PBG resultó ser competitiva, afectando el K_m pero no la V_{max} . Estos hallazgos avalan la hipótesis de Levin (1971), quien había propuesto que la isomerasa posiblemente, era capaz de remover algún intermediario generado por la deaminasa el cual inhibía la actividad de esta última. En base a los resultados de Battersby y col. (1983 b) se deduce ahora fácilmente que la estimulación encontrada por Levin (1971) de la actividad de la deaminasa por agregado de isomerasa a pH's alcalinos, donde el HMB es más estable, se debía a que la isomerasa removía este intermediario inhibitorio. A pH's menores no se observa este fenómeno ya que, en estas condiciones, ocurre la ciclación del HMB a una velocidad extremadamente alta.

Battersby y col. (1983 b), en otras experiencias lograron obtener el complejo $(1-^3H)HMB$ -deaminasa covalentemente unido. Disponiendo de este sistema, los autores efectuaron ensayos tendientes a determinar cuál era la causa de que el HMB fuese liberado de la enzima. Los resultados mostraron que era la unión de la siguiente molécula de PBG a la deaminasa, lo que conducía a la rápida liberación del HMB. En ausencia de PBG, pequeñas cantidades de azafulveno y HMB estarían en equilibrio con el sistema deaminasa-bilano (bilano unido \rightleftharpoons azafulveno \rightleftharpoons bilano libre), y el HMB libre se ciclaría lentamente para convertirse en Urogen I. Sobre esta base, el efecto de la isomerasa, la cual es capaz de liberar el 72 % de HMB unido al sistema deaminasa-bilano luego de 15 minutos, puede comprenderse como debido a la remoción del bilano libre y desplazamiento del equilibrio antes mencionado.

Los estudios cinéticos de Williams y col. (1981) y Williams (1984) indicaron que la deaminasa actúa a través de un mecanismo de desplazamiento y que la reacción total está controlada por un único paso limitante de la velocidad, lo cual está en total concordancia con los resultados de Battersby y col. (1983 b).

Por último, en el mismo reporte, Battersby y col. (1983 b) postularon que la unión del PBG al sitio activo de la deaminasa, ocurría vía el grupo ϵ -amino de una lisina, demostrando además que esta enzima no tiene efecto sobre la velocidad de

formación del Urogen III a partir de HMB.

Hart y col. (1986) encontraron que cuando la deaminasa proveniente de *Euglena gracilis* se incubaba con 5-fosfato de piridoxal a pH 7 y 0 °C perdía parte de su actividad rápidamente. La diálisis de la enzima parcialmente inactivada restauraba su capacidad catalítica, por el contrario la reducción con borohidruro de sodio previa al paso de diálisis, la inactivaba permanentemente. La enzima de *Rp. spheroides* se comportó de manera similar aunque con diferencias cuantitativas. Los autores observaron que la inactivación estaba acompañada por la modificación de residuos lisina y que el PBG protegía a la enzima. Estas y otras evidencias indicaron la existencia de un residuo lisina esencial en cada molécula de enzima, sugiriéndose que el rol de ese residuo consistía en unir covalentemente la primera molécula de PBG a la deaminasa.

Por su parte, el grupo de Scott, sobre la base de sus experiencias con RMN de ^{13}C y ^3H , propusieron un mecanismo de acción para la deaminasa de *Rp. spheroides* (Evans y col., 1986 a, b), similar al postulado por Battersby y col., 1982 b (Figura III.23.). Los autores investigaron fundamentalmente el tipo de unión que existía entre la enzima y el PBG, así llegaron a demostrar que la primera molécula de sustrato se une a la enzima en dos puntos: por un lado a través de la alquilación de un grupo tiol libre con eliminación de un equivalente molar de amonio y por otro por medio de un par iónico formado entre el propionato y un residuo lisina o arginina, lo cual estaría de acuerdo con lo propuesto por Battersby y col. (1983 b); Russell y col. (1984) y Hart y col. (1986). Las etapas posteriores coinciden con las reportadas por Battersby (Figura III.20.), o sea unión consecutiva por condensación de las otras moléculas de PBG hasta formar el tetrapirrol y formación de la especie altamente reactiva azafulveno. Es necesario destacar que Evans y col. (1986 b) señalan que el primer paso de liberación del tetrapirrol se debe a la regeneración del grupo tiol libre con formación de una unión doble hexametileno (Figura III.23.). Finalmente, la especie azafulveno o su derivado, el HMB, es liberado al medio por ruptura de la unión iónica del propionato, para ciclarse a Urogen I. De acuerdo a lo expuesto en este último párrafo, el intermediario, azafulveno o HMB, permanece unido a la enzima en un solo punto antes de

ser liberado, lo cual permitiría suponer que la isomerasa podría actuar sobre el tetrapirrol aún unido a la enzima.

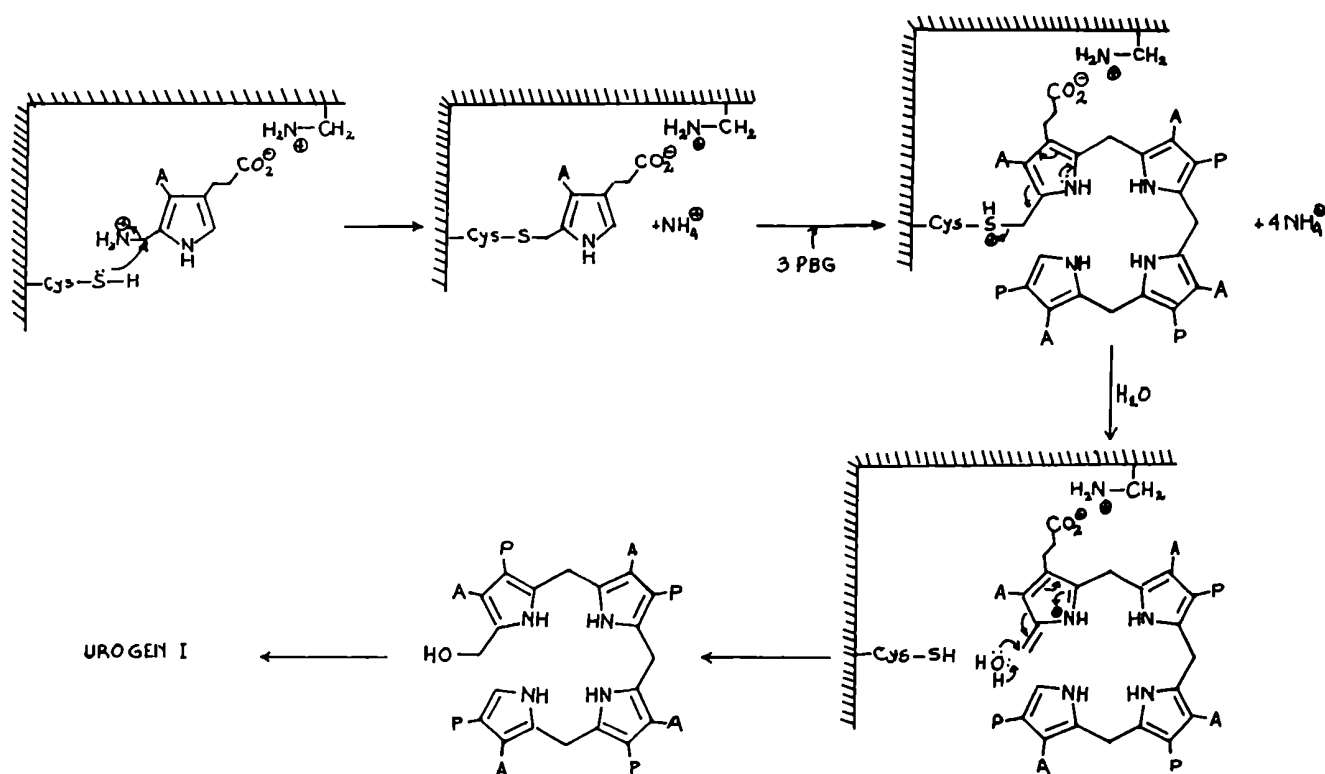


FIGURA III.23.: Unión deaminasa-PBG (Evans y col., 1986 b)

En base a todas las consideraciones y evidencias experimentales anteriores, sumadas a las obtenidas estudiando las enzimas de *Rp. palustris*, más recientemente Kotler (1988) ha propuesto un esquema para la formación de los uroporfirinógenos I y III a partir de PBG que se ilustra en la Figura III.24. En este esquema, en la etapa inicial la primer molécula de PBG se uniría a la deaminasa a través de pares iónicos, entre el nitrógeno de residuos lisina o arginina y los carboxilos de las cadenas propiónico y acetato, y además se produciría la alquilación de un resto sulfhidrilo libre, con la eliminación de un equivalente mol de amonio, en una clásica reacción de desplazamiento, según lo demostraron Battersby y col. (1983 b). Por desplazamiento de cargas, se formaría primero un intermediario D-PBG, altamente reactivo de tipo pirrolenina (etapa 2) que rápidamente se estabilizaría luego de otro desplazamiento electrónico adoptando la estructura que

se muestra en la etapa 3. Condensaciones subsiguientes cabeza-cola con nuevas moléculas de PBG llevarían a la formación de los complejos entre la deaminasa y los intermediarios di, tri y tetrapirrólicos (etapas 4 a 6), siguiendo para cada condensación la misma secuencia detallada para las etapas 1 a 3. Alcanzada la longitud del tetrapirrilmetano, este intermediario se encuentra unido al sitio activo de la deaminasa con una estructura altamente reactiva del tipo azafulveno (etapa 7). En este punto, la etapa siguiente en la liberación del tetrapirrol es la regeneración de un grupo sulfhidrilo libre y la formación de una unión metileno. Así esa especie azafulveno altamente reactiva, en condiciones apropiadas puede reaccionar con agua endógena (etapa 8) y formar el HMB (etapa 9), que químicamente cicla a Urogen I, o bien puede reaccionar con cualquier otro nucleófilo conveniente como amoníaco e hidroxilamina, que atrapa y libera de esa forma el intermediario de la enzima (Radmer y Bogorad, 1972; Davies y Neuberger, 1973; Battersby y col., 1983 b).

Si bien la unión del PBG a la deaminasa puede ocurrir en ausencia de isomerasa, es probable que *in vivo*, en presencia de PBG, la isomerasa se asocie a la deaminasa, formando el complejo natural de la PBG-asa, en el cual la isomerasa podría interactuar con el PBG a través de uno de sus restos básicos, cediendo o tomando electrones del o al hidrógeno de la molécula de PBG que está entrando a la deaminasa. Pero una vez formado el intermediario de tipo azafulveno con la longitud de un tetrapirrilmetano, la isomerasa lo emplearía como sustrato, uniéndose al mismo a través del pirrol D, al tiempo que la deaminasa se separaría para entrar en un nuevo ciclo de reacciones (etapa 10); por desplazamiento y reordenamiento electrónico se produciría un intercambio de posiciones entre el carbono 19 y el carbono 16 resultando un intermediario aún con estructura del tipo metilénpirrol en el anillo A pero con el anillo D reordenado (etapa 11).

Análogamente a lo ya discutido para el azafulveno ordenado, aún en el sitio activo por reacción con el agua endógena, se liberaría un HMB isomerizado (etapa 12) que se ciclaría rápidamente a Urogen III, al tiempo que la isomerasa quedaría en condiciones de participar en una nueva secuencia de reacciones.

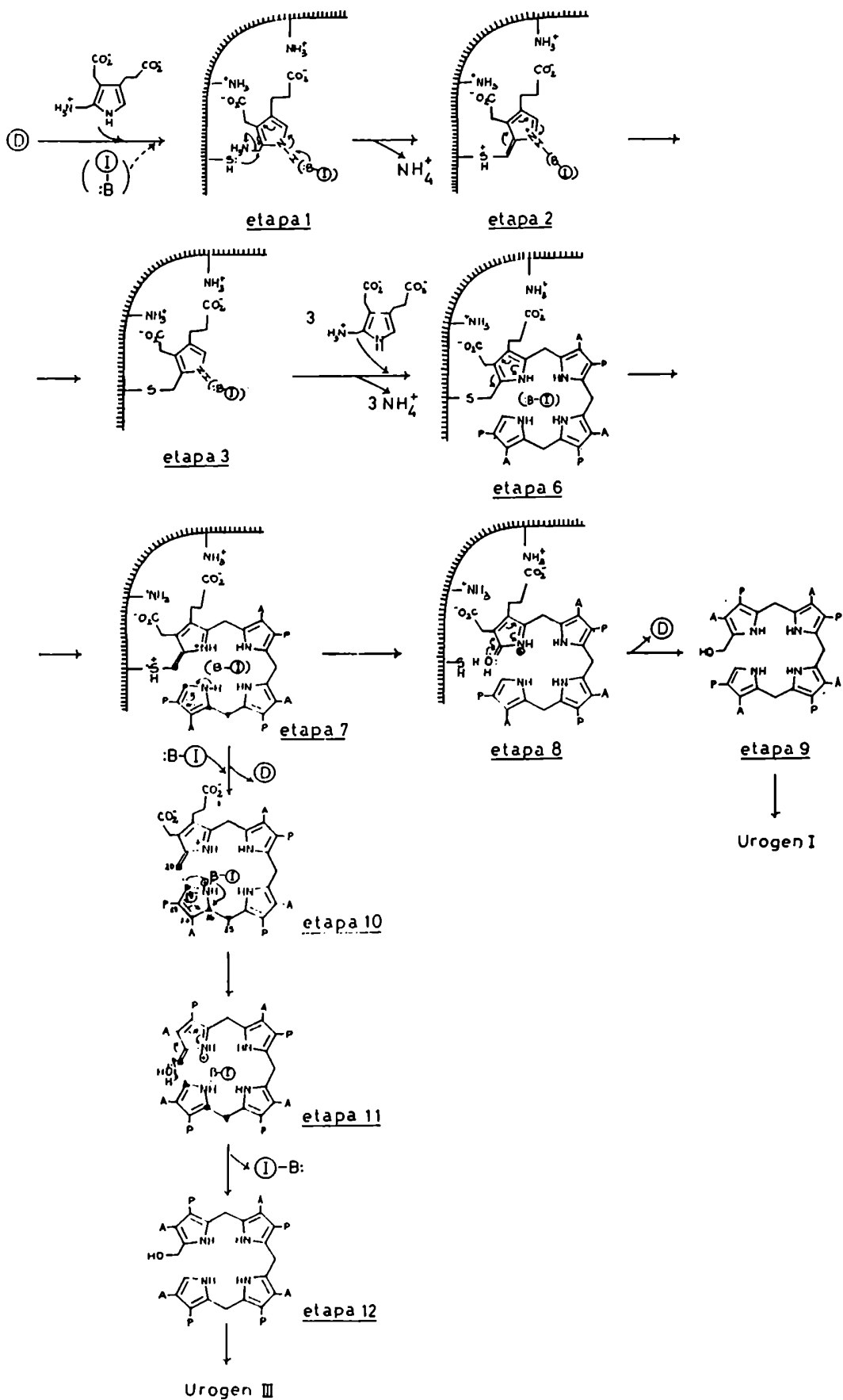


FIGURA III.24.: Esquema para la formación enzimática de uroporfirinas I y III a partir de PBG.

(D) y \curvearrowright : deaminasa; (I)-B: isomerasa; (▼) C₁₅; (▲) C₁₆; (●) C₁₉; (■) C₂₀

III.5. ESTUDIOS GENETICOS

Ya en 1980, estudios con híbridos de células somáticas de ratón y humanos, revelaron que el locus para la deaminasa humana, mapea en el cromosoma 11. Estos resultados fueron confirmados, extendiéndolos a híbridos de células similares conteniendo un único cromosoma 11 o varias deleciones del mismo (Meisler y col., 1981) e investigando la expresión de esta enzima en eritrocitos de pacientes con una trisomía en la región 11 qter (De Verneuil y col., 1982), estableciéndose que la deaminasa está codicada por un único gen estructural.

Otro grupo de investigadores (Raich y col., 1986) clonó y secuenció el cDNA, o sea el DNA que complementa el mRNA que codifica a la deaminasa humana, empleándolo para estudiar las cantidades relativas del correspondiente mRNA presente en varios tejidos y líneas celulares. También se realizaron estudios similares a partir de mRNA que codifica a las formas humanas eritropoyéticas y no-eritropoyéticas de la deaminasa (Grandchamp y col., 1987). La comparación de las secuencias revela que las dos especies de mRNA difieren en sus extremos 5', encontrándose que el PM mayor para la isoenzima de tejido no-eritropoyético se debe a la presencia de un péptido adicional de 17 aminoácidos en el extremo N-terminal. Basándose en estos resultados los autores propusieron que existe un único gen estructural para la deaminasa que puede transcribirse por dos promotores diferentes, produciendo dos formas de mRNA para la deaminasa de tejidos eritropoyéticos y no-eritropoyéticos, existiendo así una estricta expresión específica del tejido para esta enzima; en otras palabras, la producción de dos isoenzimas a partir de un único gen.

Recientemente, se clonó por primera vez el gen de la deaminasa de una bacteria, se obtuvo el cDNA de la deaminasa de *E. coli* y se estableció su secuencia de bases y de allí, la de aminoácidos, para lo cual el PM calculado fue del orden de 40.000 dalton (Jordan y col., 1986).

En 1987, Desnick clonó el gen de la isomerasa humana, lo cual abre enormes posibilidades en cuanto al estudio de las fallas genéticas en la porfiria cutánea eritropoyética.

III.6. REFERENCIAS

- Anderson, P. & Desnick, R. (1980) *J. Biol. Chem.* 255 (5), 1993.
- Araujo, L.; Lombardo, M.; Rossetti, M. & Batlle, A. (1987) *Rev. Arg. Microbiol.* 19, 109.
- Araujo, L.; Lombardo, M.; Rossetti, M. & Batlle, A. (1988) *Comp. Biochem. Physiol.*, en prensa.
- Batlle, A. & Rossetti, M. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 251.
- Battersby, A.; Hunt, E. & Mc Donald, E. (1973 a) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 442.
- Battersby, A.; Gibson, K.; Mc Donald, E.; Mander, L.; Moron, J. & Nixon, L. (1973 b) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 768.
- Battersby, A.; Mc Donald, E.; Williams, D. & Wurziger, H. (1977 a) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 113.
- Battersby, A.; Buckley, D.; Mc Donald, E. & Williams, D. (1977 b) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 115.
- Battersby, A.; Johnson, D.; Mc Donald, E. & Williams, D. (1977 c) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 117.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Mc Donald, E. & Meegan, M. (1978) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 185.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Matcham, G.; Mc Donald, E. & Gustafson-Potter, K. (1979 a) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 316.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Matcham, G. & Mc Donald, E. (1979 b) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 539.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Gustafson-Potter, K.; Matcham, G. & Mc Donald, E. (1979 c) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1155.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Matcham, G. & Mc Donald, E. (1980) *Nature* 285 (5759), 17.
- Battersby, A.; Buckley, D.; Johnson, D.; Mander, L.; Mc Donald, E. & Williams, D. (1981 a) *J. Chem. Soc., Perkin Trans I*, 2779.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Matcham, G. & Pandley, P. (1981 b) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 20, 293.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Meegan, M.; Mc Donald, E. & Wurziger, H. (1981 c) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2786.

- Battersby, A.; Fookes, C.; Gustafson-Potter, K.; Mc Donald, E. & Matcham, G. (1982 a) J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 2413.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Gustafon-Potter, K.; Mc Donald, E. & Matcham, G. (1982 b) J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 2427.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Matcham, G.; Mc Donald, E. & Hollenstein, R. (1983 a) J. Chem. Soc., Perkin Trans. I., 3031.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Hart, G.; Matcham, G. & Pandley, P. (1983 b) J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 3041.
- Berry, A. & Jordan, P. (1981) Biochem. Soc. Trans. 9 (3), 231.
- Bogorad, L. (1958 a) J. Biol. Chem. 233, 501.
- Bogorad, L. (1958 b) J. Biol. Chem. 233, 510.
- Bogorad, L. (1962) en "Methods in Enzymology" (Eds. S.P. Colowick y N.O. Kaplan), vol. 5, p. 885. Academic Press, N.Y.
- Bogorad, L. (1963) Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 676.
- Bullock, E.; Johnson, A.; Makman, E. & Shaw, K. (1958) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1430.
- Burton, G.; Fagerness, P.; Hosozawa, S.; Jordan, P. & Scott, I. (1979) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 202.
- Carell, E. & Kahn, J. (1964) Arch. Biochem. Biophys. 108, 1.
- Carpenter, A. & Scott, J. (1961) Biochim. Biophys. Acta 52, 195.
- Christenson, W.; Reddy, V. & Piper, W. (1986) Life Sciences 38, 1679.
- Clement, R.; Tofilon, P. & Piper, W. (1981) Nutr. Cancer 3, 1.
- Clement, R.; Kohashi, M. & Piper, W. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 214 (2), 657.
- Cookson, G. & Rimington, C. (1954) Biochem. J. 57, 476.
- Cornford, P. (1964) Biochem. J. 91, 64.
- Correa García, S.; Rossetti, M. & Batlle, A. (1988) en preparación.
- Dauner, H.; Gunzer, G.; Heger, I. & Muller, G. (1976) Z. Physiol. Chem. 357, 147.
- Davies, R. & Neuberger, A. (1973) Biochem. J. 133, 471.
- Desnick, R. (1987) en Xth Ann. Intl. Meet. Tetrapyrrole Group, England.

- De Verneuil, H.; Phung, N.; Nordmann, Y.; Allard, D.; Leprince, F.; Jerome, H.; Aurias, A. & Rethore, M. (1982) *Hum. Genet.* 60, 212.
- Evans, J. Davies, R.; Boyd, A.; Ichinose, I.; Mackenzie, N.; Scott, I. & Baxter, R. (1986 a) *Biochemistry* 25, 896.
- Evans, J.; Burton, G.; Fagerness, P.; Mackenzie, N. & Scott, I. (1986 b) *Biochemistry* 25, 905.
- Falk, J. y Dresel, E. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 39, 458.
- Franck, B.; Fels, G. & Ufer, G. (1977 a) *Angew. Chem. Int. Engl.* 16, 652.
- Franck, B.; Fels, G.; Ufer, G. & Rowold, A. (1977 b) *Angew. Chem. Int. Engl.* 16, 651.
- Frydman, R. & Feinstein, G. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 350, 358.
- Frydman, R. & Frydman, B. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 193.
- Frydman, R. & Frydman, B. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 293, 506.
- Frydman, R. & Frydman, B. (1975 a) *FEBS lett.* 52, 317.
- Frydman, B. & Frydman, R. (1975 b) *Acc. Chem. Res.* 98, 1589.
- Frydman, B.; Reil, S.; Valasinas, A.; Frydman, R. & Rapoport, H. (1971) *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2738.
- Frydman, R.; Tomaro, M.; Wanschelbaum, A. & Frydman, B. (1972 a) *FEBS lett.* 26, 203.
- Frydman, R.; Valasinas, A.; Rapoport, H. & Frydman, B. (1972 b) *FEBS lett.* 25, 309.
- Frydman, R.; Valasinas, A. & Frydman, B. (1973) *Biochemistry* 12, 80.
- Frydman, R.; Valasinas, A.; Levy, S. & Frydman, B. (1974) *FEBS lett.* 38, 134.
- Frydman, R.; Levy, E.; Valasinas, A. & Frydman, B. (1978 a) *Biochemistry* 17 (1), 110.
- Frydman, R.; Levy, E.; Valasinas, A. & Frydman, B. (1978 b) *Biochemistry* 17 (1), 115.

- Fumagalli, S.; Rossetti, M.; Juknat de Geralnik, A.; Kotler, M. & Batlle, A. (1982) *Anales Asoc. Quim. Argentina* 70, 375.
- Fumagalli, S.; Kotler, M.; Rossetti, M. & Batlle, A. (1985) *Int. J. Biochem.* 17 (4), 485.
- Grandchamp, B.; De Verneuil, H.; Beaumont, C.; Chretien, S.; Walter, O. & Nordmann, Y. (1987) *Eur. J. Biochem.* 162, 105.
- Hart, G. & Battersby, A. (1985) *Biochem. J.* 232, 151.
- Hart, G.; Leeper, F. & Battersby, A. (1984) *Biochem. J.* 222, 93.
- Hart, G.; Abell, C. & Battersby, A. (1986) *Biochem. J.* 240, 273.
- Higuchi, M. & Bogorad, L. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 244, 401.
- Jordan, P. & Berry, A. (1980) *FEBS lett.* 112 (1), 86.
- Jordan, P. & Berry, A. (1981) *Biochem. J.* 195, 177.
- Jordan, P. & Seehra, J. (1979) *FEBS lett.* 104, 364.
- Jordan, P. & Shemin, D. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1019.
- Jordan, P.; Burton, G.; Nordlov, H.; Schneider, M.; Pryde, L. & Scott, I. (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 204.
- Jordan, P.; Nordlov, H.; Burton, G. & Scott, I. (1980) *FEBS lett.* 115 (2), 269.
- Jordan, P.; Marshall, L. & Thomas, S. (1986) en "Porphyrins and Porphyrins" (Ed. Y. Nordmann), vol. 134, p. 83. Colloque INSERM (John Libbey Eurotest Ltd).
- Juknat de Geralnik, A. (1983) Tesis Doctoral (UBA)
- Juknat de Geralnik, A.; Rossetti, M. & Batlle, A. (1981) *Int. J. Biochem.* 13 (3), 343.
- Juknat, A.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1988 a) *Z. Naturforsch* 43 c, 351.
- Juknat, A.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1988 b) *Z. Naturforsch* 43 c, 357.
- Kohashi, M.; Clement, R.; Tse, J. & Piper, W. (1984) *Biochem. J.* 220, 755.
- Kotler, M. (1988) Tesis Doctoral (UBA).

- Kotler, M.; Fumagalli, S.; Juknat, A. & Batlle, A. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* 87 B (3), 601.
- Kotler, M.; Juknat, A.; Correa, S. & Batlle, A. (1988 a) *Med. Sci. Res.* 16, 323.
- Kotler, M.; Juknat, A.; Correa, S.; Princ, F. & Batlle, A. (1988 b)
- Levin, E. (1971) *Biochemistry* 10, 4669.
- Levin, E. & Coleman, D. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 4248.
- Lockwood, W. & Benson, A. (1960) *Biochem. J.* 75, 372.
- Lockwood, W. & Rimington, C. (1957) *Biochem. J.* 67, 8.
- Llambías, E. & Batlle, A. (1970 a) *FEBS lett.* 6, 285.
- Llambías, E. & Batlle, A. (1970 b) *Biochim.Biophys.Acta* 220, 552.
- Llambías, E. & Batlle, A. (1970 c) *FEBS lett.* 9 (3), 180.
- Llambías, E. & Batlle, A. (1971 a) *Biochim.Biophys.Acta* 227, 180.
- Llambías, E. & Batlle, A. (1971 b) *Biochem. J.* 121, 327.
- Llambías, E.; Locascio, G. & Batlle, A. (1971 c) *Anales Asoc. Quím. Arg.* 59, 271.
- Mathewson, J. & Corwin, A. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* 83, 135.
- Meisler, M.; Wanner, L.; Kao, F. & Jones, C. (1981) *Cytogenet. Cell Genet.* 31, 124.
- Miyagi, K.; Kaneshima, M.; Kawakami, J.; Nakada, F.; Petryka, Z. & Watson, C. (1979) *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 76 (12), 6172.
- Miyagi, K.; Petryka, Z.; Kaneshima, M.; Kawakami, J. & Pierach, C. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 769.
- Parke, P. (1978) *World Rev. Nutr. Diet* 29, 107.
- Piper, W. & van Lier, R. (1977) *Mol. Pharmacol.* 13, 1126.
- Pluscec, J. & Bogorad, L. (1970) *Biochemistry* 9, 4736.
- Pollack, S. & Russell, C. (1978) *FEBS lett.* 90 (1), 47.
- Radmer, R. & Bogorad, L. (1972) *Biochemistry* 11, 904.
- Raich, N.; Romeo, P.; Dubart, A.; Beaupain, D.; Cohen-Solal, M. & Goussens, M. (1986) *Nucleid Acids Res.* 14 (15), 5955.
- Rossetti, M. (1978) Tesis Doctoral (UBA).
- Rossetti, M. & Batlle, A. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 277.

- Rossetti, M.; Parera, V. & Batlle, A. (1976) *Acta Physiol. Latinoam.* 26 (5), 371.
- Rossetti, M.; Juknat de Geralnik, A. & Batlle, A. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 781.
- Rossetti, M.; Juknat de Geralnik, A.; Kotler, M.; Fumagalli, S. & Batlle, A. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 761.
- Rossetti, M.; Lombardo, M.E.; Juknat de Geralnik, A.; Araujo, L. & Batlle, A. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* 85 B (2), 451.
- Rossetti, M.; Araujo, L.; Lombardo, M.; Correa García, S. & Batlle, A. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* 87 B (3), 593.
- Russell, C. & Pollack, S. (1978) *J. Chromat.* 166, 632.
- Russell, C. & Rockwell, P. (1980) *FEBS lett.* 116 (2), 99.
- Russell, C.; Pollack, S. & James, J. (1984) *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 43, 1545.
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969 a) *Biochim. Biophys. Acta* 191, 130.
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969 b) *FEBS lett.* 3, 223.
- Sancovich, H.; Ferramola, A.; Batlle, A.; Kivilevich, A. & Grinstein, M. (1976) *Acta Physiol. Latinoam.* 26 (5), 379.
- Scott, A.; Ho, K.; Kajiwara, M. & Takahashi, T. (1976) *J. Am. Chem. Soc.* 98 (6) 1589.
- Scott, A.; Burton, G.; Jordan, P.; Matsumoto, H.; Fagerness, P. & Pryde, L. (1980) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* , 384.
- Smythie, E. & Williams, D. (1988) *Biochem. J.* 251, 237.
- Stark, W.; Hart, G. & Battersby, A. (1986) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 465.
- Stella, A.; Parera, V.; Llambías, E. & Batlle, A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 252, 481.
- Stevens, E.; Frydman, R. & Frydman, B. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 158, 496.
- Tephly, T. (1975) en "Porphyrins in Human Diseases", Report of Discussions, p. 128.
- Valasinas, A.; Frydman, R.; Diaz, L. & Frydman, B. (1978) XIV Reunión Nacional de la SAIB, Abstract D-26.

- Wider de Xifra, E.; Batlle, A.; Stella, A. & Malamud, S. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 819.
- Williams, D. (1984) *Biochem. J.* 217, 675.
- Williams, D.; Morgan, G.; Mc Donald, E. & Battersby, A. (1981) *Biochem. J.* 193, 301.

REGULACION Y PORFIRIAS

	Página
IV.1. Regulación	92
IV.1.1. Mecanismos de control	92
IV.1.1.1. Control a través de cambios en la actividad enzimática del ALA-S	93
IV.1.1.2. Control genético a través de cambios en la cantidad de enzima	93
IV.1.1.3. Control por especialización tisular	95
IV.1.1.4. Compartimentalización <u>intra</u> celular	97
IV.1.1.5. Control por otros constitu- yentes del medio ambiente celular	99
IV.1.1.6. Control por interconexión con otros caminos metabólicos	99
IV.1.2. Rol de las enzimas del camino metabólico del hemo	100
IV.2. Porfirias	101
IV.2.1. PBG-asa y porfirias	102
IV.2.2. Porfiria experimental	106
IV.3. Referencias	109

IV. REGULACION Y PORFIRIAS

IV.1. REGULACION

Los procesos metabólicos ocurren, en la célula viva, en perfecto equilibrio y coordinados de tal manera que aseguran la utilización adecuada de los sustratos necesarios para la síntesis celular. Evidentemente, para que esto suceda funcionan los "mecanismos de control", los cuales se llevan a cabo a diferentes niveles y de varias formas.

La biosíntesis de porfirinas responde también a esta regla general, más aún constituye un caso notable por el alto grado de eficiencia con la cual se lleva a cabo. Por ejemplo, en el caso del hombre se excretan o acumulan, por día, una cantidad sumamente pequeña de precursores: ALA y PBG e intermediarios del camino metabólico del hemo. No solamente la conversión enzimática de PBG a porfirinas favorece la formación de isómeros fisiológicos de la serie III en un 99,9 %; sino que de la producción diaria de 460 μ moles de hemoglobina, sólo se excretan en precursores y porfirinas entre 20 - 24 μ moles, es decir, apenas un 5 %. Este notable rendimiento es el resultado de una serie de controles estrechamente ligados; si uno o más de ellos fallan o son defectuosos, como ocurre en las porfirias, el enfermo sintetiza grandes cantidades de intermediarios con serias consecuencias para el organismo (Batlle y col., 1981).

IV.1.1. Mecanismos de control

Se postularon diferentes mecanismos de control en la biosíntesis de porfirinas, entre los cuales se pueden citar:

- a) Control a través de cambios en la actividad enzimática del ALA-S
- b) Control genético a través de cambios en la cantidad de enzima limitante.
- c) Control por especialización tisular.
- d) Control por localización tisular.
- e) Control por efectos de constituyentes del medio ambiente o del medio celular.

- f) Control por interconexión con otros caminos metabólicos.
- g) Rol de las enzimas reguladoras del camino metabólico del hemo.

IV.1.1.1. Control a través de cambios en la actividad enzimática del ALA-S

Este tipo de control es un mecanismo de regulación rápido que posee la célula; ya que, produciendo variaciones en la actividad de la(s) enzima(s) limitante(s) de un camino metabólico, varía la velocidad de biosíntesis de un determinado compuesto. En el caso de la síntesis de tetrapirroles, la enzima limitante es el ALA-S, ya que en la mayoría de las células, las demás enzimas involucradas se encuentran presentes en cantidades no limitantes.

Entre los numerosos y variados mecanismos que regulan la actividad enzimática dentro de la célula, se encontró que el ALA-S está sujeta a un mecanismo de "control por retroinhibición" o "control por producto final", el cual consiste en que el producto final (hemo) ejerce un efecto inhibitorio sobre la enzima, que está basado en efectos alostéricos. La primera prueba de que el mecanismo de retroinhibición opera en la biosíntesis de hemo, provino de los estudios de Lascelles (1964), quien demostró que cuando hacía crecer *Rp. spheroides* en un medio deficiente en hierro, se acumulaban grandes cantidades de Copro. El agregado de pequeñas cantidades de metal corregía el defecto, postulándose que el hierro actuaba favoreciendo la síntesis de hemo, que a su vez actuaba inhibiendo la actividad de la primera enzima, el ALA-S (Figura IV.1.I).

IV.1.1.2. Control genético a través de cambios en la cantidad de enzima

El control genético de la síntesis proteica de la o las enzimas limitantes es otra forma de regulación celular de un camino metabólico.

Ames y Martin (1964) y más tarde, Kornberg (1965) demostraron que en la célula algunas enzimas están en cantidades constantes, mientras que otras sólo se sintetizan cuando actúan ciertas sustancias inductoras sobre el material genético del núcleo celular.

En el caso de la biosíntesis de porfirinas, el

mecanismo que se postuló para explicar la síntesis de ALA-S y su control se basa en la conocida hipótesis de Jacob y Monod (Figura IV.1.R).

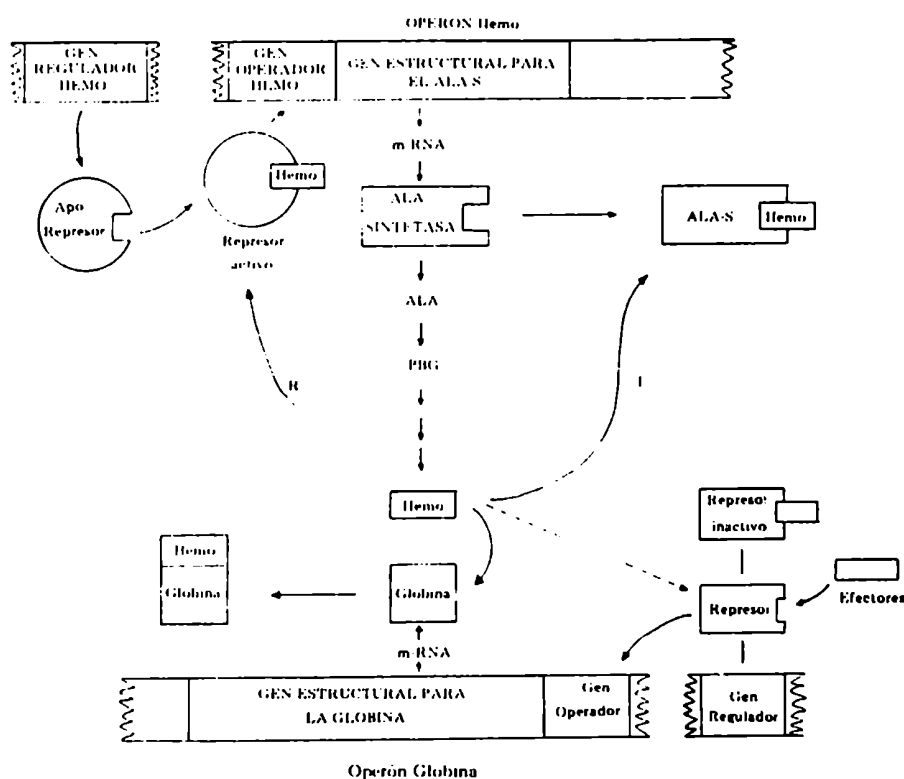


FIGURA IV.1.: Mecanismo de regulación de la biosíntesis del hemo.
 I: por inhibición feed-back del ALA-S; R: por represión de la síntesis proteica del ALA-S.
 Su coordinación con el hipotético esquema de control de la síntesis de hemoglobina y globina.

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

El gen estructural, una porción del DNA cromosómico del operón hemo, que lleva la información para la síntesis del ALA-S, se activa por medio de un gen operador, que a su vez responde a

la presencia de un represor activo, el cual actúa normalmente reprimiendo este gen operador. Cuando el gen operador está reprimido se detiene la producción de RNA mensajero y por ende se interrumpe la síntesis del ALA-S. Este mecanismo de represión constituye un sistema de control "lento". El represor activo se forma por la unión de un apo-represor proteico producido por el gen regulador del operon hemo y un co-represor, que en este caso se propone que es la molécula de hemo.

De esta manera, el hemo controla su propia síntesis actuando rápidamente por un mecanismo de retroinhibición y lentamente, por un mecanismo de represión de la síntesis proteica de ALA-S.

IV.1.1.3. Control por especialización tisular

Analizando la información disponible acerca de la biosíntesis de tetrapirroles en distintos tejidos, se llegó a la conclusión de que parece existir una correlación simple y directa entre los niveles de actividad de las enzimas de este camino y su capacidad para formar las hemoproteínas (Sassa y Kappas, 1981).

La mayor parte del hemo corporal lo aportan los eritroblastos de la médula ósea en forma de hemoglobina, mientras que el hígado sintetiza, en condiciones normales, aproximadamente el 15 % de este pigmento (Sassa y Kappas, 1981).

En la Tabla IV.1. se muestra la velocidad de formación de hemo expresada como la concentración de ALA necesaria para mantener los niveles normales de las hemoproteínas hemoglobina, catalasa y citocromo P₄₅₀ en sangre e hígado de rata.

Por otro lado, existen una gran cantidad de drogas, productos químicos y hormonas que producen la estimulación de la síntesis de hemo en el hígado (Granick y Urata, 1963 a; Granick, 1966), mientras que hay pocos productos químicos que inducen la síntesis del pigmento en células eritroideas (Wada y col., 1967). Además, la hipoxia (Falk y Porra, 1964) y la eritropoyetina (Bottomley y Smuller, 1969) aumentan la actividad de ALA-S en células eritroideas. Estos hechos experimentales dieron motivo a que se estudiara el control de la biosíntesis del hemo de acuerdo a la especialización tisular, con especial referencia al tejido hepático y a las células eritroideas.

TABLA IV.1.: Especialización tisular. Concentración relativa y velocidades de recambio de hemoproteínas en hígado y médula ósea de rata.

HEMOPROTEINA	TEJIDO	FUNCION	CONCENTRACION	$t_{1/2}$	ALA
			nmol/g	h	
Hemoglobina	Médula ósea	Transporte de oxígeno	4.470,0	600-720	99,0
Catalasa	Hígado	Descomposición del peróxido de hidrógeno	5,3	29	3,5
Citocromo b, c, c ₁ , a + a ₁			16,4	140	1,3
Citocromo b ₅		Transporte de electrones	12,0	55	1,6
Citocromo P ₄₅₀			22,5	(*) 8 47	14,4

$t_{1/2}$: vida media; ALA: concentración de ALA para la síntesis de la hemoproteína; (*) bifásica

- Hígado: Dos hechos experimentales importantes indican que en el hígado, la síntesis de hemo está controlada primariamente por la actividad del ALA-S. Uno de ellos se basa en la baja actividad de la enzima en hígado normal "no inducido" (30-100 nmoles ALA/g hígado de rata.hora; Hutton y Gross, 1970) y en la elevada inducción del ALA-S en hepatocitos intoxicados, o sea, en células en las que el mecanismo de detoxificación de drogas, y en consecuencia el citocromo P₄₅₀ deben funcionar aceleradamente. En estos casos la síntesis de ALA celular aumenta entre 50 y 100 veces, lográndose velocidades del orden de 1.140 nmoles/g de hígado.h en ratas intoxicadas con DDC y fenilbutazona

(De Matteis, 1973) y de 6.000 nmoles/g de hígado.h en embriones de pollo tratados con DDC y AIA (Whiting y Granick, 1976 a, b). Otra de las características que ubican al ALA-S como limitante en este tejido es su alta velocidad de recambio, recordemos que en hígado de rata la vida media de la enzima es de 70 minutos (Tschudy y col., 1965) y de 3 horas en ratón y en embrión de pollo (Sassa y Granick, 1970; Gayathri y col., 1973).

- Células eritroides: El control de la síntesis del hemo en células eritroides contempla otras variantes a las ya vistas en hígado. En primer término debemos recordar, que la utilización del hemo para la síntesis de distintas hemoproteínas, debe encontrarse muy bien coordinada con la formación de sus componentes proteicos específicos, y basándonos en estos hechos es posible proponer un esquema que explique los mecanismos de control que operan en la síntesis de hemoglobina en las células eritroides.

El monómero de hemoglobina está constituido por hemo y globina, en relación 1:1. Estudios efectuados en reticulocitos y médula de conejo, demostraron que existe un paralelismo entre ambos componentes, comprobándose que un exceso de hemo inhibe su propia síntesis por los mecanismos ya descritos, pero por otro lado estimula la síntesis de globina. Se postuló que la entrada de sustancias efectoras en las células eritroides, posiblemente eritropoyetina o metabolitos de células vecinas o aún el mismo hemo, transforman el represor activo en un represor incapaz de ejercer su acción sobre el gen operador de la globina, y en consecuencia comienza la síntesis de globina, que utiliza el hemo libre disponible para la formación de hemoglobina (Figura IV.1.). Como resultado de esta conjugación, queda menos hemo disponible, de manera que el represor del gen operador hemo pierde actividad y a su vez, se reinicia la síntesis de ALA-S y hemo. Para explicar la relación 1:1 de hemo a globina, se propone que la proteína no se libera de los polisomas hasta que no se haya enrollado correctamente alrededor del hemo.

IV.1.1.4. Compartimentalización intracelular

Teniendo en cuenta la localización celular de las enzimas involucradas en la biosíntesis de porfirinas, llama la atención el hecho de que determinadas etapas tengan lugar dentro de

la mitocondria, mientras que otras en el citoplasma (Figura IV.2.).

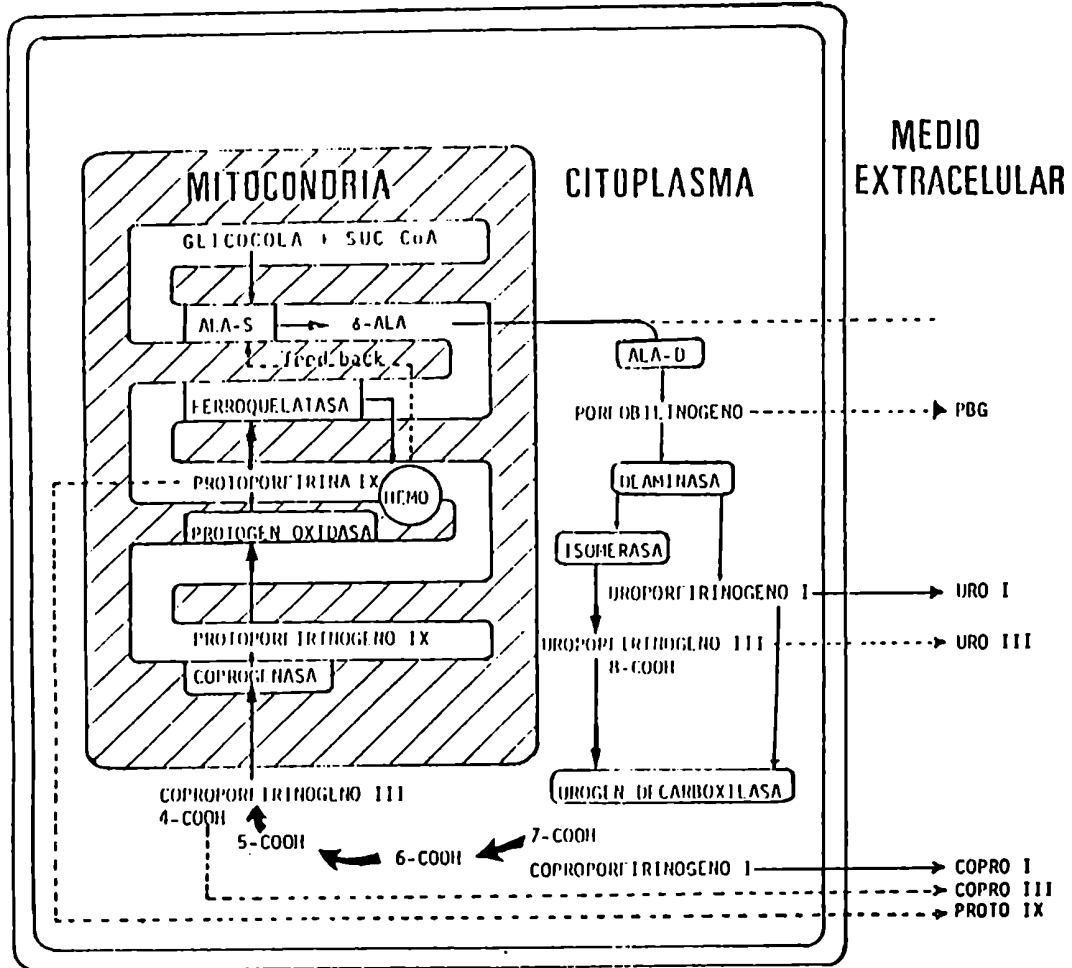


FIGURA IV.2.: Localización intracelular de las enzimas involucradas en el camino biosintético del hemo

De esta manera, los metabolitos deben difundir a través de la membrana mitocondrial, lo cual podría constituir de por sí, un mecanismo regulatorio, especialmente si alguno de estos sustratos se encontraran en ciertas etapas unidos a proteínas.

Es importante tener en cuenta que la concentración estacionaria de ALA dentro de la mitocondria juega un papel relevante en la regulación pues determina la cantidad de ALA disponible en el citoplasma para la síntesis de tetrapirroles. A su vez, la

concentración constante de ALA mitocondrial está dirigida por el nivel de succinil CoA generado en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Vemos entonces, que la maquinaria regulatoria de este camino es relativamente compleja y está interconectado con otros caminos metabólicos (Batlle y col., 1981).

IV.1.1.5. Control por otros constituyentes del medio ambiente celular

Existen numerosos constituyentes del medio ambiente celular que podrían influenciar de diversas maneras la síntesis de tetrapirroles; sin embargo, dos han sido objeto de importantes estudios debido a su acción regulatoria. Ellos son el oxígeno y las condiciones de iluminación.

- Oxígeno: Tanto la tensión de oxígeno como el estado de óxido-reducción de la célula, influyen diferencialmente las distintas etapas de este camino metabólico. Así, por ejemplo, la conversión del Coprogen III a Protogen IX es una reacción necesariamente aeróbica mientras que la inserción de hierro en Proto IX para dar hemo está favorecida por condiciones anaeróbicas (Batlle y col., 1981).
- Iluminación: En las bacterias fotosintéticas las condiciones de iluminación desempeñan un papel importante en la regulación de la biosíntesis de clorofila; como en el caso del oxígeno, una elevada intensidad luminosa reprime la síntesis de ALA-S, de manera que se sugirió que en estos organismos los efectos de la luz y el oxígeno podrían responder a un mecanismo de control común, vinculado con la concentración de algún carrier en la cadena de transporte de electrones y eventualmente con los niveles de ATP (Batlle y col., 1981).

IV.1.1.6. Control por interconexión con otros caminos metabólicos

Los mecanismos de regulación del hemo se encuentran muy bien coordinados con los de formación de proteínas específicas que constituyen las distintas hemoproteínas (ejemplo: producción de globina) y también presentan una estrecha correlación con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, que regula el nivel de succinil CoA en la mitocondria.

Asimismo, se demostró que en ciertos organismos la

actividad de ALA-S está controlada por las actividades relativas de dos enzimas, cistationasa y rodenasa, involucradas en el metabolismo de los compuestos sulfurados y en la formación y degradación respectivamente de una trisulfocistina que actúa como activador del ALA S en determinadas condiciones (Wider de Xifra y col., 1976; Vázquez y col., 1980; Vázquez, 1984).

Estamos en presencia entonces, de otro ejemplo más de la extraordinaria eficiencia y complejidad de los finos sistemas de control de los cuales depende, y al mismo tiempo asegura, el normal funcionamiento de la intrincada maquinaria celular.

IV.1.2. Rol de las enzimas del camino biosintético del hemo

Además del ALA-S otras enzimas ocupan un lugar destacable en el control de la biosíntesis de tetrapirroles.

El grupo de Padmanaban propuso que en *Neurospora crassa* el ALA-D es la enzima limitante y regulatoria, llegando a proponer en 1969, un mecanismo para explicar su regulación (Padmanaban y Sarma, 1964; Padmanaban y col., 1967; Muthu-Krishman y col., 1968, 1969; Padmanaban y Malathi, 1972).

En 1977, Labbé-Bois y Volland observaron que en *S. cerevisiae* también el ALA-D ejercía una acción regulatoria y más tarde, Mattoon y col. (1978) determinaron que en mutantes de la misma levadura, la regulación funciona tanto a nivel de ALA-S como ALA-D.

Por otro lado en pacientes con porfiria aguda intermitente se le adjudicó a la deaminasa un rol secundario en la regulación de la biosíntesis de hemo, o sea en situaciones en que el ALA-S está de-reprimida, la actividad de deaminasa puede ser limitante y constituir así otro punto de control (Brodie y col., 1977 a).

IV.2. PORFIRIAS

Las porfirias abarcan un grupo de enfermedades que son una consecuencia de desórdenes en el metabolismo de las porfirinas. Este desorden, en un amplio grupo, es hereditario y pertenece a la familia de errores congénitos del metabolismo; pero también puede ser adquirido.

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

De acuerdo al tejido afectado por este desorden metabólico, las porfirias pueden clasificarse en:

- Porfirias eritropoyéticas: que abarcan la porfiria eritropoyética congénita, la protoporfiria eritropoyética y la coproporfiria eritropoyética.

Porfirias hepáticas: que incluyen la porfiria cutánea tardía, la aguda intermitente, la porfiria variegata o mixta y la coproporfiria hereditaria.

- Porfiria hepatoeritropoyética o doble

- Porfirinurias

Esta clasificación tiene un sentido ordenador, pero debemos señalar que el trastorno, en algunos casos, no es exclusivo de un determinado tejido, eritropoyético o hepático, sino que se puede encontrar en ambos. Por este motivo, se intentó emplear otro carácter ordenador basado en la sintomatología clínica y según el cual las porfirias se clasifican de la siguiente manera (Moore y Disler, 1985).

- Porfirias cutáneas: caracterizadas por acumulación de porfirinas y fotosensibilidad.

Porfirias agudas: en las cuales se acumula ALA y PBG y el paciente presenta un síndrome neuroabdominal.

- Porfirias mixtas: en éstas se acumulan porfirinas y precursores y el enfermo presenta síntomas cutáneos y agudos.

En algunas porfirias hay una síntesis exacerbada de por

porfirinas en el hígado o en médula ósea, lo que conduce a su a c u m u l a c i o n e n s a n g r e y p o s t e r i o r i a l e o p o s t e r i o n e n o t r a s p o r f i r i a s, hay un significativo aumento de la excreción de precursores, ALA y/o PBG por orina, que tienen su origen en el hígado. Cuando las porfirinas están en exceso, la piel se hace sensible a la luz dando origen a las "porfirias cutáneas". En cambio, cuando la concentración de precursores está aumentada, la enfermedad se caracteriza por típicos ataques agudos de dolores abdominales, cefaleas, vómitos, parálisis y manifestaciones psiquiátricas, dando lugar a las "porfirias agudas". Existe además, un tipo de "porfiria mixta o variegata", en la cual pueden ocurrir simultáneamente tanto los síntomas agudos como los cutáneos, en esta clase de porfiria se producen en exceso y excretan tanto porfirinas como precursores.

En los últimos 20 años el estudio de las porfirias ha entrado en la etapa genético enzimológica y es por este motivo, que un profundo y exhaustivo conocimiento del camino metabólico "normal" del hemo y las enzimas involucradas provee las bases para la comprensión de las fallas que dan origen a estas enfermedades.

Es de hacer notar que, de acuerdo a la sobreproducción y acumulación de porfirinas y/o precursores, observada en cada clase de porfiria, se llegó a deducir las enzimas involucradas en la falla metabólica (Figura IV.3.). Se debe tener en cuenta además, que la elevada actividad de la enzima limitante ALA-S, es la consecuencia generalmente de un error en el sistema genético de control, por lo general secundario al error primario (genético o adquirido), que puede ser un bloqueo o inhibición de alguna de las enzimas siguientes, lo cual al disminuir los niveles de hemo, deprime el sistema regulador.

De allí la actual importancia de los estudios enzimológicos, desde el punto de vista del diagnóstico y terapéutica de las porfirias.

IV.2.1. PBG-asa y porfirias

Strand y col. (1970) demostraron que en pacientes con porfiria aguda intermitente (PAI), la actividad de deaminasa en hígado estaba disminuía un 50 %, postulando que el defecto enzimático primario en esta enfermedad sería la deficiencia de deaminasa.

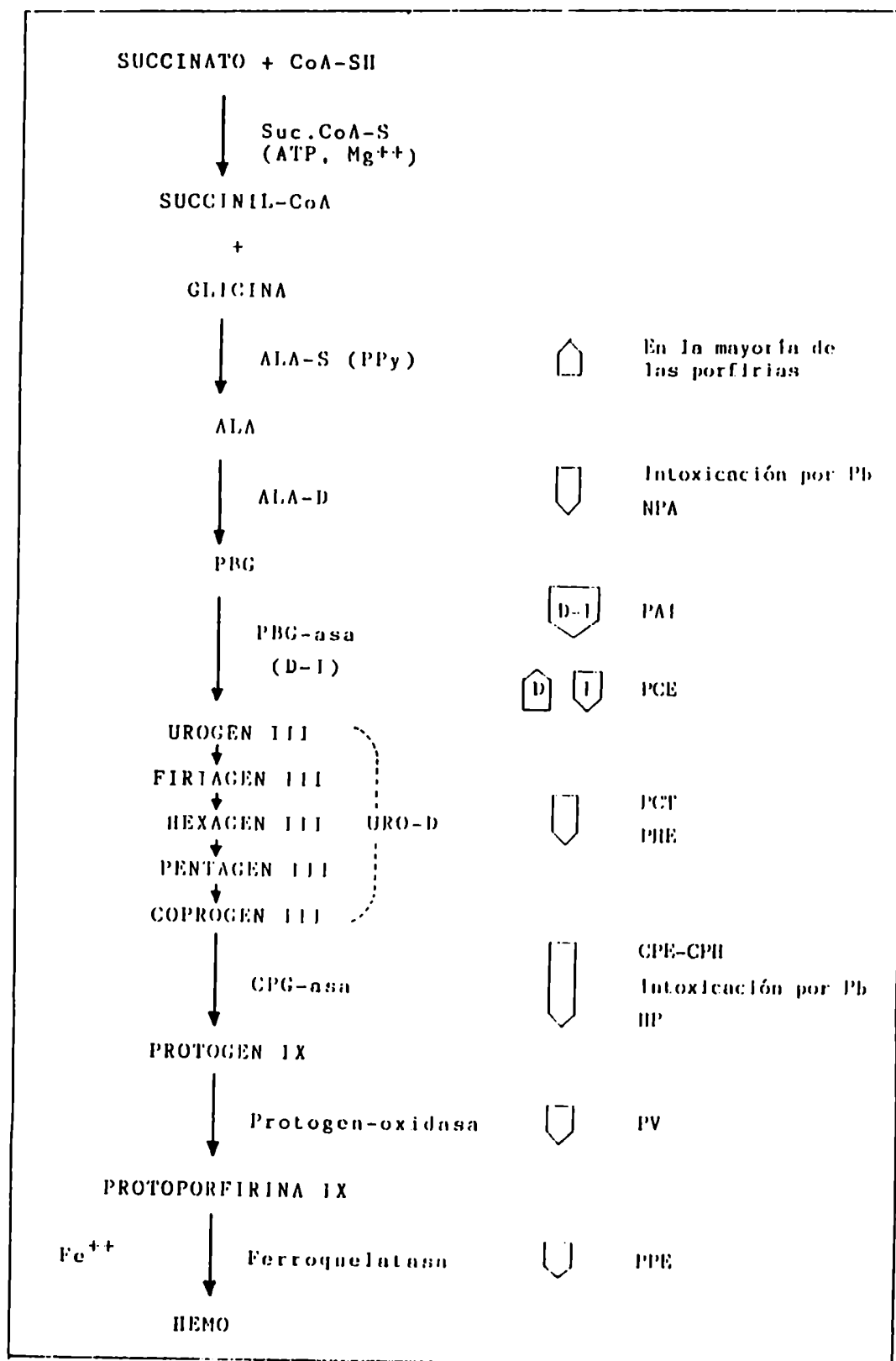


FIGURA IV.3.: Alteraciones enzimáticas en las porfirias.
 ▾; ▴ disminución; aumento de la actividad enzimática. D-I: deaminasa - isomerasa

La PAI se origina en un error genético congénito (Garrod, 1908, 1923) que tiene una expresión variable. Asimismo, es necesario destacar que ciertos factores farmacológicos, nutricionales y metabólicos pueden precipitar los síntomas de esta enfermedad. Es una de las porfirias hepáticas agudas que se manifiesta con mayor incidencia en las mujeres (Goldberg, 1959; Goldberg y Rimington, 1962), sin distinción de razas y con una prevalencia dentro de la tercera década de vida para las mujeres y de la cuarta para los hombres (Goldberg y Moore, 1980). Esta característica sugiere claramente el importante papel de las hormonas en la manifestación de la enfermedad.

Este tipo de porfiria se caracteriza por presentar períodos de ataques agudos y períodos de remisión, durante los cuales no se observa ninguna alteración psicofísica.

Bioquímicamente, la orina fresca de pacientes con PAI contiene grandes cantidades de ALA y PBG, tanto en los períodos agudos como en los de remisión, mientras que la excreción de porfirinas en orina y heces responde generalmente a un patrón normal. De allí que estos pacientes no presenten fotosensibilización. En estudios realizados sobre familiares de pacientes con PAI, se observó que muchos portadores del defecto genético, son clínicamente asintomáticos y en tales individuos la excreción urinaria de ALA y PBG puede encontrarse dentro o cerca de los valores normales. El hecho de que esta enfermedad sea clínica y aún bioquímicamente latente, sugiere nuevamente que el defecto genético puede expresarse de manera variable y enfatiza también la importancia de los factores exógenos o metabólicos en la precipitación de los síntomas.

Se caracteriza clínicamente por un amplio espectro de manifestaciones neurológicas y psiquiátricas, sin producción de lesiones dermatológicas. El síndrome más frecuente, que acompaña a más del 85 % de los ataques, es un agudo dolor abdominal, generalmente difuso, con localización preferencial en el hemiabdomen inferior, de tipo cólico, continuo y sin contracturas, pero sensible a la palpación profunda, que no cede con analgésicos ni opiáceos.

Por otra parte, cerca del 70 % de los ataques presentan taquicardia sinusal con ritmos cardíacos de hasta 160 latidos/minuto e hipertensión arterial sistemática.

Asimismo, debido a que en las porfirias hereditarias, como la PAI, el defecto enzimático está presente en todos los tejidos, incluyendo el riñón, la orina de estos pacientes presenta grandes cantidades de ALA y PBG, no sólo de origen hepático sino también renal.

En el sistema nervioso, Pelroth y col. en 1966 describen dos manifestaciones correspondientes al daño hipotalámico. La primera es un exagerado pasaje de hormona antidiurética a la circulación como resultado de la afección de las fibras supra-ópticas y de los núcleos paraventriculares, que produce oliguria sin edema, retención de agua e hiponatremia (con vómitos) y convulsiones por intoxicación con agua (Stein y col., 1972). La segunda, una falta de control de la hormona de crecimiento por el hipotálamo, con la virtual desaparición de la misma después de la sobrecarga de glucosa (Pelroth y col., 1967; Stein y Tschudy, 1970).

También se encuentran fenómenos motores con parálisis y paresias de extremidades y músculos respiratorios, laringeos, deglutorios, en ocasiones, parálisis ascendente de Laundry, algias musculares, hipotonía, hiporreflexia e impotencia funcional. La complicación más seria es la insuficiencia respiratoria.

Son frecuentes los estados de excitación, ansiedad confusional, insomnio, frigidez y fuertes dolores de cabeza.

Las anormalidades neurológicas asociadas a la PAI y también a las otras porfirias agudas, sugieren una participación de los sistemas nerviosos central, autónomo y periférico; sin embargo, los cambios patofisiológicos que se observan en la neuropatía porfírica, aún no están aclarados

Como se mencionó anteriormente, el defecto enzimático primario de la PAI se podría deber a un bloqueo parcial a nivel de la conversión del PBG en uroporfirinógenos por acción de la PBG-asa (Batlle y Rossetti, 1977), pudiéndose localizar tanto a nivel de esta enzima como en su componente deaminasa. Este bloqueo generaría una disminución en la velocidad de síntesis de hemo y por de-represión tendría lugar un incremento secundario en la actividad de ALA-S.

Además, como este defecto enzimático está determinado genéticamente, es de esperar que se pueda detectar no solamente en el hígado sino también en todos los tejidos en los cuales la

enzima es activa normalmente. Es así que en estudios posteriores, se desarrollaron métodos simples que permitieron establecer que la actividad de esta enzima en eritrocitos, cultivos de fibroblastos y otros tejidos está considerablemente disminuída (Batlle y Rossetti, 1977).

Es importante enfatizar que, actualmente, la determinación de la deaminasa o del complejo PBG-asa en sangre, constituye un elemento fundamental para el diagnóstico de esta porfiria, en casos clínicamente manifiestos y en portadores asintomáticos de la anormalidad genética, incluyendo niños y aún fetos.

Por otra parte, señalaremos que existen varias terapias específicas para el control del ataque agudo en los enfermos de PAI; se han sugerido tratamientos con carbohidratos (Brodie y col., 1977 b), el uso de β -bloqueantes (Douer y col., 1978), hematina (Watson y col., 1978) y más recientemente, el empleo de ácido fólico (Wider de Xifra y col., 1980; Juknat de Geralnik y col., 1981) y glucagon (Forrest y Oberg, 1982; Forrest, 1983).

IV.2.2. Porfiria experimental

Con la introducción de los hipnóticos Sulfonal y Trional en la clínica médica, se observaron casos de hematoporfirinuria tóxica en pacientes tratados con estos compuestos (Stokvis, 1889; Harley, 1890; Salkowski, 1891; Hammarsten, 1892) y muy pronto se comprobó que el sulfonal producía porfirinuria en perros y conejos (Stokvis, 1895).

En 1932, Duesberg describió un caso fatal de intoxicación por Sedormid, con síntomas de porfiria aguda, demostrándose años más tarde que esta droga producía porfiria experimental en ratas y conejos (Schmid y Schwartz, 1952) con un cuadro compatible al de las porfirias hepáticas y un patrón de excreción urinario semejante al de la PAI (Schmid y col., 1954).

Estos primeros experimentos culminaron con el descubrimiento realizado por Granick y Urata (1963 b) y Granick (1966) sobre la importancia del aumento en la actividad de ALA-S hepática en la porfiria inducida por diversos fármacos.

A partir de entonces se encontraron otros compuestos, a demás del Sedormid y Sulfonal, capaces de inducir porfiria hepática en animales de laboratorio, o en cultivos primarios de hígado

de embrión de pollo. Todas estas drogas porfirinogénicas tienen la propiedad de estimular la actividad del ALA-S hepática y también la capacidad de producir el agotamiento del hemo hepático, ya sea por aceleración de su degradación o por inhibición de su síntesis (De Matteis, 1982).

Se estudiaron ampliamente distintos tipos de fármacos en animales de experimentación y hay evidencias de que alguno de ellos, utilizados en terapéutica humana o que se encuentran como contaminantes del medio ambiente pueden alterar el metabolismo de las porfirinas. Entre estos compuestos podemos citar los fármacos no saturados que contienen grupos alilo o etil-alilo en su cadena lateral, como el AIA, las dihidropiridinas como el DDC; antibióticos como la griseofulvina y los hidrocarburos polihalo-genados como por ejemplo el tan conocido hexaclorobenceno (HCB) (Figura IV.4.).

Si bien todos estos compuestos originan una sobreproducción hepática de los productos intermedios de la vía metabólica del hemo, existen diferencias significativas tanto en el mecanismo de acción como en el cuadro bioquímico obtenido y la aparición de los síntomas de la porfiria resultante (De Matteis, 1982). Así, por ejemplo, el AIA produce una porfirinuria con las características bioquímicas de las porfirias agudas hepáticas humanas, provocando una rápida acumulación hepática de ALA, PBG y porfirinas, que son excretadas por orina. Asimismo el DDC y la griseofulvina originan una sobreproducción de Proto que se acumula en hígado y se excreta por heces, o sea, dan lugar a cuadros similares bioquímicamente a la porfiria variegata humana durante la fase aguda; mientras que en ratones causan un síndrome semejante a la protoporfiria eritropoyética (Magnus, 1980).

Finalmente, los compuestos policlorados producen un incremento en la excreción de las porfirinas urinarias altamente carboxiladas y una marcada inhibición de la URO-D hepática (Bleckenhorst y col., 1976; Elder y col., 1976; San Martín de Viale y col., 1977; Smith y col., 1979; Tiepermann y col., 1980; De Matteis y col., 1981; Battle y col., 1986), o sea, patrones similares a la porfiria cutánea tardía humana.

NOTA: Para mayor información y profundización de las porfirias

humanas, así como para tomar conocimiento del control y tratamiento a seguir en cada caso, se sugiere consultar la "Tesis Doctoral de Victoria Parera" (1985) UBA

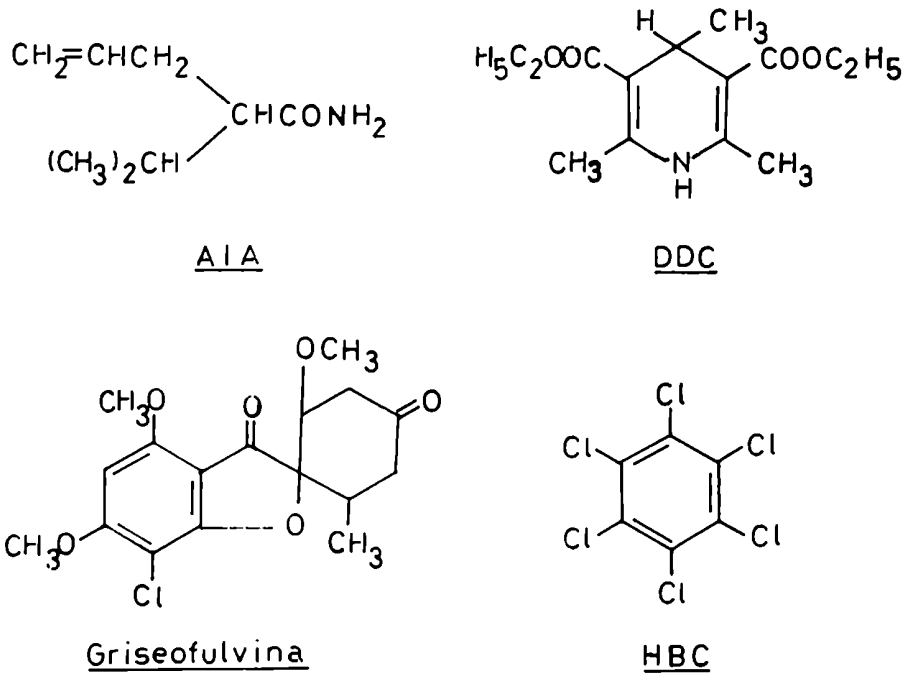


FIGURA IV.4.: Estructura de los cuatro principales compuestos inductores de porfiria hepática experimental

IV.3. REFERENCIAS

- Ames, B. & Martin, R. (1964) *Annu. Rev. Biochem.* 33, 235.
- Batlle, A. & Rossetti, M. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 251.
- Batlle, A.; Magnin, P. & Wider, E. (1981) en "Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento". (Ed. EUDEBA).
- Batlle, A.; Enriquez de Salamanca, R.; Magnin, P.; Afonso, S.; Chinarro, S.; Stella, A. & Wider, E. (1986) *Rev. Arg. Dermatol.* 67, 1.
- Blekkenhorst, G.; Pimstone, N.; Weber, B. & Eales, L. (1976) *Ann. Clin. Research* 8 Suppl. 17, 108.
- Bottomley, S. & Smuller, G. (1969) *J. Lab. Clin. Med.* 74, 445.
- Brodie, M.; Moore, M.; Thompson, G.; Campbell, B. & Goldberg, A. (1977 a) *Biochem. Soc. Trans.* 5, 1466.
- Brodie, M.; Moore, M.; Thompson, G. & Goldberg, A. (1977 b) *Clin. Sci. Mol. Med.* 53, 365.
- De Matteis, F. (1973) *Enzyme* 16, 266.
- De Matteis, F. (1982) "Endocrinología, Clínica y Metabolismo" 4, 67.
- De Matteis, F.; Gibbs, A.; Farmer, P. & Lamb, J. (1981) *FEBS Lett.* 129, 328.
- Douer, D.; Weinberger, A.; Pinkhes, J. & Atsmon, A. (1978) *J. Ann. Ass.* 240, 766.
- Duesberg, R. (1932) *Medizinische Wochenschrift* 79, 1821.
- Elder, G.; Evans, J. & Matlin, S. (1976) *Clin. Sci. Mol. Med.* 51, 71.
- Falk, J. & Porra, J. (1964) *Biochem. J.* 90, 66.
- Forrest, R. (1983) *J. Royal Soc. Med.* 76, 800.
- Forrest, R. & Öberg, K. (1982) *Trans. Sweedish Med. Soc.* 91, 157.
- Garrod, A. (1908) *Lancet* ii, I 214.
- Garrod, A. (1923) en "Inborn errors of Metabolism". 2da. edición Frowde (London: Hodder y Stoughton)
- Gayathri, A.; Rao, M. & Padmanaban, G. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 299.

- Goldberg, A. (1959) Quart J. Med. N.S. 28, 183.
- Goldberg, A. & Moore, M. (1980) Clinics in Hematology 9, 225.
- Goldberg, A. & Rimington, C. (1962) en "Diseases of Porphyrin Metabolism". Springfield, Illinois.
- Granick, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 1359.
- Granick, S. & Urata, G. (1963 a) J. Biol. Chem. 238, 821.
- Granick, S. & Urata, G. (1963 b) Metabolic Regulation 5, 77.
- Hammarsten, D. (1892) Skandinavishes Archiv. für Physiologie 3, 319.
- Harley, V. (1890) Brit. Med. J. II, 1169.
- Hutton, J. & Gross, S. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 141, 284.
- Juknat de Geralnik, A.; Rossetti, M. & Batlle, A. (1981) Int. J. Biochem. 13, 343.
- Kornberg, H. (1965) Symp. Soc. Gen. Microbiol. 15, 8.
- Labbe-Bois, R. & Volland, C. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 179, 565.
- Lascelles, J. (1964) en "Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation" (Ed. W.A. Benjamin Inc.) New York, Amsterdam.
- Magnus, J. (1980) Clin. Haematol. 9, 273.
- Mattoon, J.; Malamud, D.; Brunner, A.; Braz, G.; Carvajal, E.; Lancashire, W. & Banek, A. (1978) en "Biochemistry and Genetics of Yeasts, Pure and Applied Aspects", p. 317 (Ed. M. Bacila, B. Horecker y A. Stoppani). Academic Press, New York.
- Moore, M. & Disler, P. (1985) Clin. Dermatol. 3, 7.
- Muthu-Krishman, S.; Padmanaban, G. & Sarma, P. (1968) Biochem. Biophys. Res. Comm. 31, 333.
- Muthu-Krishman, S.; Padmanaban, G. & Sarma, P. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4241.
- Padmanaban, G. & Malathi, K. (1972) Biochem. J. 128, 27 p.
- Padmanaban, G. & Sarma, P. (1964) Arch. Biochem. Biophys. 108, 362.
- Padmanaban, G.; Muthu-Krishman, S. & Sarma, P. (1967) Biochem. Biophys. Acta 141, 187.

- Perlroth, M.; Tschudy, D.; Marver, H.; Berard, C.; Ziegel, R.; Rechcige, M. & Collins, A. (1966) *Ann. J. Med.* 41, 149.
- Perlroth, M.; Tschudy, D.; Waxman, A. & Odell, W. (1967) *Metabolism* 16, 87.
- Salkowski, E. (1891) *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie* 15, 286.
- San Martín de Viale, L.; Ríos de Molina, M.; Wainstok de Calmanovich, R. & Tomio, J. (1977) *Biochem. J.* 168, 393.
- Sassa, S. & Granick, S. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 517.
- Sassa, S. & Kappas, A. (1981) en "Advances in Human Genetics", vol. 11, pp. 121. (Ed. Harris-Hirschhorn). Plenum Press, New York.
- Schmid, R. & Schwartz, S. (1952) *P. Soc. Exp. Biol. Med.* 81, 685.
- Schmid, R.; Schwartz, S. & Watson, C. (1954) *Arch. Int. Med.* 93, 167.
- Smith, A.; Cabral, J. & De Matteis, F. (1979) *Chem. Biol. Interactions* 27, 353.
- Stein, J. & Tschudy, D. (1970) *Medicine* 49, 1.
- Stein, J.; Curl, F.; Valsamis, M. & Tschudy, D. (1972) *Amer. J. Med.* 53, 784.
- Stokvis, B. (1889) *Nederlands Tydschrift voor Genesbunde* 25, 409.
- Stokvis, B. (1895) *Seitschrift fur Klinische Medizin* 28, 1.
- Strand, L.; Felscher, B.; Redecker, A. & Marver, H. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67, 1315.
- Tiepermann, R.; Koss, G. & Doss, M. (1980) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1217.
- Tschudy, D.; Marver, H. & Collins, A. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 21, 480.
- Vázquez, E. (1984) Tesis Doctoral, UBA.
- Vázquez, E.; Wider de Xifra, E. & Batlle, A. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 721.

- Wada, D.; Sassa, S.; Takaku, F.; Yano, Y.; Urata, G. & Nakao, K. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 148, 585.
- Watson, C.; Pierach, L.; Bossenmaier, I. & Cardinale, R. (1978) *Adv. Int. Med.* 23, 265.
- Whiting, M. & Granick, S. (1976 a) *J. Biol. Chem.* 251, 1340.
- Whiting, M. & Granick, S. (1976 b) *J. Biol. Chem.*, 251, 1347.
- Wider de Xifra, E.; Sandy, J.; Davies, R. & Neuberger, A. (1976) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 273, 79.
- Wider de Xifra, E.; Battle, A.; Stella, A. & Malamud, S. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 819.

MATERIALES Y METODOS

CAPITULO 1

MATERIALES

	Página
I.1. Fuente enzimática	113
I.2. Sustrato: Porfobilinógeno	113
I.3. Geles empleados	113
I.4. Reactivos utilizados	113
I.5. Equipos empleados	114

I. MATERIALES

I.1. FUENTE ENZIMATICA

En la realización del presente trabajo se emplearon dos fuentes enzimáticas: 1) hígado de cerdo recién faenado, el cual fue donado por "Frigorífico INGA" y almacenado a -20°C por un período no mayor a dos meses; 2) sangre humana, cedida gentilmente por el "Servicio de Hemoterapia" del Hospital Ramos Mejía de esta Capital, la cual provino de dadores sanos tomados al azar, pertenecientes a cualquier grupo y factor sanguíneos. Esta fue procesada en el mismo día de su extracción.

I.2. SUSTRATO: PORFOBILINOGENO

El PBG se obtuvo enzimáticamente según la metodología descrita por Sancovich y col. (1970), a partir de ALA-D de hígado bovino y ALA adquirido en Sigma Chemical Co., USA.

I.3. GELES EMPLEADOS

Se utilizaron columnas empaquetadas con geles de Sephadex G-25 grueso y G-100, los cuales se adquirieron en Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia. Además, se empleó DEAE celulosa proveniente de Merck, AG-Darmstadt, Alemania.

I.4. REACTIVOS UTILIZADOS

Sulfato de amonio: Proveniente de Merck AG-Darmstadt, Alemania, grado analítico y droga sólida. El peso de sal necesario para pasar de una concentración a otra se calculó mediante el nomograma correspondiente.

Gel de fosfatos: El gel de fosfatos se preparó empleando drogas de grado analítico y siguiendo el método de Keilin y Hartree (1951).

Bromuro de cianógeno: El bromuro de cianógeno utilizado fue adquirido en Hoppe, Lab. Hoch.

Los solventes empleados en las cromatografías fueron de grado analítico o para uso espectrofotométrico. Los demás reactivos y solventes usados fueron también de grado P.A., provenientes de distintas fuentes comerciales.

Todas las soluciones se prepararon utilizando agua desionizada y bidestilada.

I.5. EQUIPOS EMPLEADOS

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas International B-20 y Sorvall RC-5B.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en espectrofotómetros Beckman modelos DB y 35 y Metrolab RC 325 BD.

Las mediciones de pH se efectuaron en un Termo-pHmetro modelo TPX y en un pHmetro Altronix.

Las soluciones proteicas se concentraron en un equipo Amicon empleando una membrana del tipo PM 10.

Las cromatografías para la caracterización y determinación cuantitativa de las porfirinas esterificadas se realizaron en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Varian modelo 5000, equipado con un inyector con loop (capacidad 10 μ l). La detección de las porfirinas a 404 nm fue efectuada con un detector de longitud de onda variable Varian modelo 50. El registro gráfico se obtuvo mediante un registrador Varian modelo 9176 y la integración de las áreas de cada pico de absorbancia se llevó a cabo mediante un integrador Varian modelo CDS 111L. En este caso los solventes utilizados fueron de grado HPLC.

METODOS

	Página
II.1. Separación de hemoglobina de eritrocitos	115
II.2. Sistema standard de incubación	115
II.2.1. PBG-asa y deaminasa de hígado de cerdo	115
II.2.2. PBG-asa y deaminasa de glóbulos rojos humanos	116
II.2.3. Deaminasa insolubilizada de glóbulos rojos humanos	117
II.3. Unidad enzimática	117
II.4. Determinación de la actividad enzimática	118
II.4.1. Estimación espectrofotométrica de las porfirinas formadas en medio ácido	118
II.4.2. Estimación de PBG remanente	118
II.5. Determinación del contenido proteico	119
II.5.1. Método de Warburg y Christian	119
II.5.2. Método de Lowry	119
II.5.3. Método de Lowry modificado	120
II.5.4. Método de Bradford	120
II.6. Determinación de las porfirinas formadas y del tipo isomérico de las mismas	121
II.6.1. Esterificación de las porfirinas formadas durante las incubaciones	121
II.6.2. Determinación cuantitativa de las porfirinas totales esterificadas	121
II.6.3. Determinación de las porfirinas formadas y del tipo isomérico	122

	Página
II.7. Determinación del peso molecular	123
II.7.1. Cromatografía por tamices moleculares	123
II.7.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida	123
II.8. Técnicas para la inmovilización de enzimas	126
II.8.1. Activación de la Sepharosa 4B	126
II.8.2. Inmovilización de deaminasa de eritrocitos	126

II. METODOS

II.1. SEPARACION DE HEMOGLOBINA DE ERITROCITOS

Para separar la hemoglobina (Hb) se empleó el método de Scott (1976) modificado por Bustos y col. (1980), que básicamente se compone de las siguientes etapas:

- a) Centrifugar la sangre entera a 3.300 x g por 10 minutos, descartando posteriormente el plasma.
- b) Lavar los glóbulos rojos (GR) una o dos veces con solución fisiológica, descartando los lavados.
- c) Ajustar el pH a 8 con amoníaco concentrado
- d) Agregar gota a gota una mezcla butanol:cloroformo (1:0,4) en la relación 1 ml GR:0,21 ml de mezcla. Dicha mezcla debe adicionarse en tres etapas consecutivas y con agitación constante a 0 °C (baño de hielo y agua), -5 °C (baño de hielo, sal y agua) y -20 °C (freezer).
- e) Agitar con una varilla durante 15 minutos a 0 °C.
- f) Dejar en reposo a 20 °C durante 1 hora, al cabo de la cual se centrifuga a 21.000 x g 20 minutos.

Como resultado de esta última etapa se obtiene un precipitado denso formado por Hb desnaturalizada y un sobrenadante, el cual contiene la enzima. De esta forma la fracción que nos interesa no es totalmente acuosa, pues posee los solventes orgánicos adicionados en d). Por este motivo, es necesario dializar durante aproximadamente 20 horas contra buffer fosfato de sodio 0,01 M pH 6,8. Muchas veces, al finalizar este proceso, queda un pequeño precipitado formado por proteínas lábiles a la diálisis que se elimina por centrifugación a 21.000 x g durante 20 minutos. La fracción resultante es la que denominamos "Sobrenadante de diálisis" en las experiencias descriptas más adelante.

II.2. SISTEMA STANDARD DE INCUBACION

II.2.1. PBG-asa y deaminasa de hígado de cerdo

El medio de incubación contenía, salvo que se indique lo

contrario: 2 ml de preparación enzimática, 60 µg de PBG (88,5 µM) y buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 hasta completar un volumen final de 3 ml para la deaminasa.

Por otra parte, el sistema de incubación de la PBG-asa consistía de: 2 ml de fracción enzimática, 60 µg de PBG (88,5 µM) y buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,6-7,8 hasta completar 3 ml de volumen final.

En todos los casos, se hicieron blancos en los que la preparación enzimática se reemplazó por el buffer de incubación, de esta manera se corrigen los datos de actividad, pues se restan las porfirinas formadas no enzimáticamente.

Las incubaciones se realizaron en oscuridad, a 37 °C, con agitación constante y durante 2 horas, en aerobiosis para la deaminasa y en anaerobiosis para la PBG-asa.

La reacción se detuvo por desproteínización con ácido clorhídrico concentrado, el cual se agregó hasta alcanzar una concentración final en el incubado de 5 %. Posteriormente se expuso a luz blanca durante 20 minutos con el objeto de oxidar los porfirinógenos a porfirinas.

La proteína precipitada se filtró por papel plegado, lavándose el precipitado dos veces con 1 ml de ácido al 5 % cada vez. Los filtrados se reunieron determinándose en los mismos las porfirinas totales formadas y en algunas ocasiones, a efectos comparativos, el PBG remanente.

11.2.2. PBG-asa y deaminasa de glóbulos rojos humanos

En esta oportunidad, el sistema standard de incubación para ambas enzimas contenía, salvo que se indique lo contrario: 0,2 ml de preparación enzimática, 60 µg de PBG (265,5 µM) y buffer Tris-HCl 0,05 M hasta completar un volumen final de 1 ml. El pH utilizado durante la incubación fue 7,1-7,2 para la deaminasa y 8,2 para la PBG-asa.

Las incubaciones se realizaron en oscuridad, a 37 °C, con agitación constante, bajo una atmósfera aeróbica y durante 1 hora.

La reacción se detuvo por desproteínización empleando 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 10 %, la concentración final

de este ácido en el incubado fue del 5 %.

La metodología seguida con estos incubados es análoga a la descrita en el ítem anterior, así como también, es necesario destacar que se realizaron blancos de sustrato, idénticos a los indicados previamente.

II.2.3. Deaminasa insolubilizada de glóbulos rojos humanos

Para la medición de la actividad de la enzima inmovilizada, el sistema standard de incubación fue el siguiente: 0,2 ml de Sepharosa-enzima (resuspendida en 0,2 ml de buffer), 60 μg de PBG (177,0 μM) y un volumen adecuado de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,1-7,2 hasta completar 1,5 ml.

Se incubó durante 1 hora en aerobiosis, oscuridad, a 37 °C y con agitación mecánica vigorosa para evitar que el gel decante.

En todos los casos, se realizaron blancos conteniendo los mismos componentes que las mezclas de reacción, excepto que la preparación enzimática se reemplazó por igual volumen de buffer de incubación.

II.3. UNIDAD ENZIMATICA

Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de sintetizar 1 nmol de porfirinas/período de incubación o de consumir 1 nmol de PBG/período de incubación, bajo las condiciones experimentales standard. Es de hacer notar que el período de incubación fue de 1 hora para deaminasa y PBG-asa de eritrocitos humanos y de 2 horas para las mismas enzimas de hígado porcino.

La actividad específica se expresa entonces como nmoles de porfirinas formadas/período de incubación x mg de proteína o nmoles de PBG consumido/período de incubación x mg de proteína.

II.4. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

II.4.1. Estimación espectrofotométrica de las porfirinas formadas en medio ácido

La cantidad total de porfirinas formadas durante la incubación se estimó espectrofotométricamente en la solución ácida (Rimington, 1960) empleando la fórmula corregida de Rimington y Sveinsson (1950). Este método se basa en las lecturas de las densidades ópticas a 380 nm, 430 nm y el máximo de Soret (400 - 410 nm, A_{\max}), calculándose la cantidad de producto formado según la siguiente expresión:

$$\text{nmoles porfirinas} = (2 A_{\max} - A_{380} - A_{430}) \times F \times V$$

donde V es el volumen de la solución, A las absorbancias medidas a las longitudes de onda indicadas en los subíndices y F es un factor que tiene un valor de 1,008 para uroporfirina en solución ácida al 5 %.

II.4.2. Estimación de PBG remanente

El método de estimación de PBG (Moore y Labbe, 1964) se basa en su reacción con el p-dimetilaminobenzaldehído (PDMAB) en medio ácido (reactivo de Ehrlich) para dar un compuesto rojizo fácilmente medible a 555 nm. El reactivo está compuesto por una solución de PDMAB (2 g) en HCl (c) (25 ml) y ácido acético glacial (75 ml) y su ventaja radica en el hecho de que es muy estable durante largo tiempo si se lo conserva en frío y oscuridad.

La técnica utilizada para la estimación de PBG consiste en hacer reaccionar una dilución apropiada de la muestra con el reactivo de Ehrlich, lo cual origina un compuesto rojizo que desarrolla su máxima coloración entre los 8 y 15 minutos y absorbe a 555 nm. A partir de los 15 minutos el color comienza a decaer, debido a la reacción del aldehído con una segunda molécula de pirrol.

Cookson y Rimington (1954) establecieron que la relación entre las concentraciones del aldehído y del ácido fuerte influyen en la velocidad de la reacción, en tanto que la concentración de ácido acético influye en el desarrollo de la intensidad de color.

II.5. DETERMINACION DEL CONTENIDO PROTEICO

II.5.1. Método de Warburg y Christian

Las lecturas de densidad óptica realizadas a 280 nm dan normalmente una medida rápida y sensible del contenido proteico en ausencia de sustancias interferentes. Frecuentemente no sucede así en preparaciones enzimáticas donde suelen estar presentes ácidos nucleicos que presentan una fuerte banda de absorción al UV. Warburg y Christian (1941) eliminaron la interferencia de los ácidos nucleicos determinando la absorción a 260 y 280 nm de mezclas conocidas de proteínas y ácidos nucleicos y calculando los coeficientes de extinción correspondientes.

El contenido proteico se calculó empleando la ecuación de Kaeckar (1947):

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

Esta expresión da resultados comparables a los de Lowry cuando el contenido de ácidos nucleicos es bajo. Por esta causa, en nuestras experiencias se utilizó este método sólo en aquellos casos en que fue necesario estimar en forma rápida la cantidad de proteína presente.

II.5.2. Método de Lowry

Cuando se trabajó con preparaciones enzimáticas disueltas en buffer fosfatos, la concentración proteica se determinó siguiendo la metodología de Lowry y col. (1951) que consiste en lo siguiente: a 0,4 ml de una dilución apropiada de la proteína se le agregan 2 ml de una solución de carbonato de sodio 2 % en hidróxido de sodio 0,1 N: sulfato de cobre.5 H₂O 0,5 % en tartrato de sodio y potasio 1 % (20:0,4 v/v). Se mezcla y se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de ese tiempo se le agrega 0,2 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu diluído al medio con agua y se agita inmediatamente. El color azul característico del complejo formado se desarrolla completamente a los 30 minutos y es muy estable con el tiempo. Luego se lee la absorbancia a 660 nm y se calcula la concentración proteica

según la siguiente fórmula:

$$\text{mg proteína/ml} = A_{660} \times f \times \text{dilución}$$

El factor f se calcula mediante una curva de calibración empleando albúmina bovina como standard.

II.5.3. Método de Lowry modificado

Con el fin de cuantificar en forma correcta el contenido proteico de extractos crudos se introdujeron algunas modificaciones a la técnica original de Lowry y col. (1951).

Se coloca 0,1 ml de extracto proteico en un tubo apropiado y se lo seca al vacío en un recipiente conteniendo una atmósfera deshidratante constituida por ácido sulfúrico concentrado (30 ml) y un tubo Pyrex con lentejas de hidróxido de sodio. Para acelerar el proceso de secado se sumerge el recipiente en un baño de agua a 80 °C. Los vapores ácidos se neutralizan colocando un intermediario conteniendo lentejas de hidróxido de sodio. La proteína seca se resuspende en hidróxido de sodio 0,6 M y la mezcla se calienta en baño de agua a 40 - 50 °C durante 30 minutos. Luego se mezclan 0,4 ml de una dilución apropiada de esta solución proteica con 2 ml de una mezcla de composición similar a la descrita en el ítem anterior, pero sin hidróxido de sodio. El resto de la metodología es idéntica a la detallada en el punto II.5.2.

II.5.4. Método de Bradford

El método de Lowry y col. (1951) se halla sujeto a interferencias tales como iones potasio, iones magnesio, EDTA, Tris, carbohidratos y reactivos de grupos tioles. Por esta causa, el contenido proteico de preparaciones enzimáticas en buffer Tris-HCl se determinó empleando la metodología de Bradford (1976).

A 0,1 ml de una dilución apropiada de la proteína en buffer Tris-HCl se le agregan 2,5 ml de una solución compuesta por 0,01 % (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7 % (p/v) de etanol (95 %) y 8,5 % (p/v) de ácido fosfórico (85 %). Se deja reaccionar y se mide la absorbancia a 595 nm luego de transcurridos 10 minutos, contra un blanco preparado con 0,1 ml del buffer correspondiente y 2,5 ml del reactivo. El color se mantiene por

espacio de 60 minutos.

La cantidad de proteína se calcula aplicando la siguiente expresión:

$$\text{mg proteína/ml} = A_{595} \times f \times \text{dilución}$$

El factor f se determina por medio de una curva de calibración, la cual se realiza empleando albúmina bovina como standard.

II.6. DETERMINACION DE LAS PORFIRINAS FORMADAS Y DEL TIPO ISOMERICO DE LAS MISMAS

II.6.1. Esterificación de las porfirinas formadas durante las incubaciones

En el proceso de esterificación de las porfirinas se siguió la metodología descrita por Batlle y Grinstein (1964) que consiste en evaporar hasta sequedad, en vacío, la solución ácida desproteïnizada proveniente de la incubación. El residuo resultante se disuelve en una mezcla esterificante constituida por ácido sulfúrico:metanol 5% (v/v) y se lo deja en oscuridad, a temperatura ambiente durante 24 a 36 horas.

II.6.2. Determinación cuantitativa de las porfirinas totales esterificadas

La extracción y determinación cuantitativa de las porfirinas esterificadas se realizó según la técnica de Batlle y Grinstein (1962). Las porfirinas esterificadas se extrajeron con cloroformo, lavándose con exceso de agua hasta acidez negativa. La emulsión formada ocasionalmente se destruyó mediante un lavado con cloruro de sodio 7%. La solución clorofórmica se filtró a través de papel plegado embebido en el mismo solvente, determinándose la cantidad total de porfirinas esterificadas presentes en el filtrado mediante la siguiente expresión:

$$\mu\text{g porfirinas} = (2 A_{\text{max}} - A_{380} - A_{430}) \times 2,721 \times v$$

donde v es el volumen de la solución y 2,721 es el factor calculado para la uroporfirina esterificada (Cornford y Benson, 1963).

II.6.3. Determinación de las porfirinas formadas y del tipo isomérico

La solución clorofórmica que contiene las porfirinas totales esterificadas se llevó a sequedad en baño de agua a 100 °C. El residuo se disolvió en un pequeño volumen de cloroformo de manera de obtener una concentración de 5-10 µg/ml. Seguidamente, las porfirinas esterificadas se filtraron a través de un filtro Millipore de 0,22 µ.

A continuación se realizaron dos tipos de determinaciones, una de ellas fue la obtención del tipo isomérico de la uroporfirina (trabajo no publicado) y la otra fue la separación de las porfirinas formadas (Polo y col., 1983).

En la primera de ellas se emplearon las siguientes condiciones:

- Solventes: acetato de etilo:n hexano (40:60, v/v).
- Flujo: 1 ml/minuto
- Presión: 25 atm
- Tiempo de retención: 32 - 34 minutos
- Volumen de muestra inyectada: 10 µl
- Columna empleada: Spherisorb S5W (Spectra - Physics) con relleno de sílica de 5 µ, provista de una pre-columna con relleno de sílica de 10 µ SI 10 de Varian.

Para la separación de los ésteres metílicos de las porfirinas formadas, las condiciones empleadas fueron las siguientes:

- Solventes: acetato de etilo:n hexano (55:45, v/v)
- Flujo: 2 ml/minuto
- Presión: 42 - 50 atm
- Tiempo de retención: 2 a 8 minutos
- Volumen de muestra inyectado: 10 µl
- Columna empleada: Spherisorb S5W (Spectra - Physics) (longitud 25 cm; $\phi_i = 4,6$ mm)

II.7. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

La determinación de los pesos moleculares de las proteínas se realizó empleando las técnicas de cromatografía por tamices moleculares y electroforesis en geles de poliacrilamida.

II.7.1. Cromatografía por tamices moleculares

Esta técnica constituye un método rápido y sencillo para determinar los pesos moleculares de las proteínas.

El armado de las columnas así como el tratamiento previo de los geles fue el descrito por Batlle (1968). Se emplearon geles de dextrano (Sephadex), calculándose el PM según la metodología de Andrews (1964, 1965).

En el caso de proteínas globulares las determinaciones están afectadas por un error aproximado del 10 %. Las causas de error más comunes son las diferencias de formas entre proteínas, la correcta determinación del volumen de elución y las diferencias de densidad de las soluciones proteicas.

La calibración de las columnas se realizó con proteínas de PM conocido, graficándose V_e/V_o (siendo V_e el volumen de elución) en función del logaritmo del peso molecular. Se obtienen así curvas de calibración como la que se representa en la Figura II.1.

II.7.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las electroforesis se realizaron siguiendo la metodología descrita por Davies (1964) y Ornstein (1964). Los geles se prepararon a partir de las siguientes soluciones stock:

- a) 0,23 ml de TEMED (N, N', N'', N''' tetrametilendiamina) disuelto en 100 ml de buffer Tris-HCl 0,48 M pH 8,9.
- b) 28 g de acrilamida; 0,735 g de bisacrilamida (N, N' metilendisacrilamida) disueltos en 100 ml de agua.
- c) 140 mg de persulfato de amonio disuelto en 100 ml de agua.

Estas soluciones se mezclan con agua en la siguiente relación: 1a:2b:4c:1 agua, v:v:v:v; se elimina el aire para prevenir la formación de burbujas durante la gelificación y la mezcla

se coloca en tubos (0,4 x 15 cm) con un extremo tapado. Al finalizar la gelificación (20 - 30 minutos) los tubos con sus extremos libres, se colocan en una cuba de electroforesis y se siembra entre 50-100 γ de cada muestra en presencia de sacarosa al 10 % y 0,05 ml de solución de azul de bromofenol (0,1 % de colorante en ácido acético al 7%). La electroforesis se desarrolla empleando como buffer Tris-glicina 0,005 M pH 8,3 conectando las cubas a una fuente de poder que aplique de 1 a 5 mA a cada tubo. El tiempo de corrida oscila entre 4 y 6 horas, luego del cual el gel se colorea con solución de amida Schwartz 10B al 1 %, disuelto en acético al 7 %, dejando en contacto el gel con el colorante durante 30 minutos. Los geles se decoloran luego con ácido acético al 7 %.

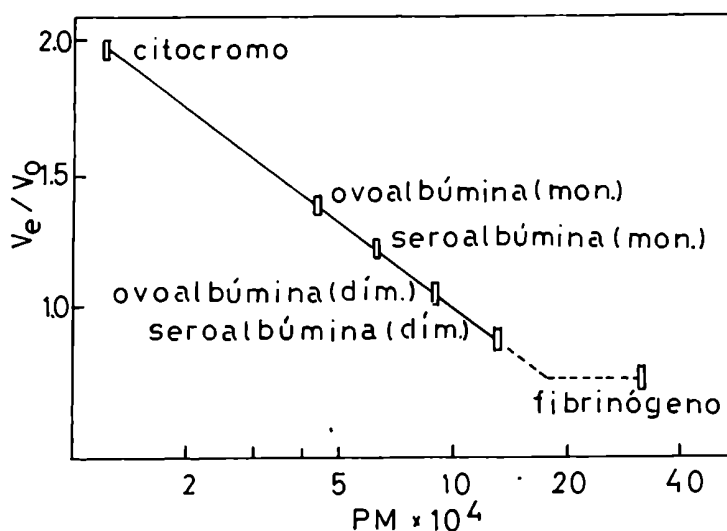


FIGURA II.1.: Curva tipo de calibración para la determinación de pesos moleculares, empleando una columna de Sephadex G-100

En los casos en que el contenido proteico de la muestra a sembrar era muy bajo se empleó como solución colorante Coomassie-blue (1,25 g en 454 ml de metanol al 50 % y 46 ml de ácido acético glacial), dejándolo en contacto durante una noche. Luego se lavan con agua y se decoloran con varios lavados de una solución de ácido acético:metanol:agua (75:50:875, v/v/v).

Por otra parte, se determinó la actividad de deaminasa

o PBG-asa en las bandas proteicas, incubando los geles con una solución de PBG por una hora. Al finalizar la incubación se lava el gel con agua y luego se incuba 10 minutos en una solución de iodo (0,003 %), se lava nuevamente con agua y se vuelve a incubarse en una solución de tiosulfato de sodio (0,006 %) hasta que desaparezca el color de la solución de iodo.

Posteriormente se observa la fluorescencia roja bajo luz UV y se marcan las posiciones de las bandas con actividad enzimática, determinando así su movilidad electroforética.

Cuando se quiso estimar el PM de la enzima, se corrió la misma conjuntamente con una serie de proteínas patrones, estimándose todas las movilidades electroforéticas mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ migración: } \left(\frac{d_1}{l_1} \times \frac{d_2}{l_2} \right) \times 100$$

donde d_1 = distancia alcanzada por la proteína al finalizar la corrida; d_2 = distancia del colorante azul de bromofenol al finalizar la corrida; l_1 = longitud del gel después de la decoloración y l_2 = longitud del gel antes del teñido.

Estas correcciones se deben hacer porque la longitud del gel varía durante el tratamiento de coloración y decoloración. Sin embargo, Smith modificó ligeramente la técnica agregando un pequeño alambre a la altura del colorante antes de este tratamiento; esto nos permite aplicar una fórmula más simplificada:

$$\% \text{ migración} = d_1/d_2' \times 100$$

donde d_2' es la distancia alcanzada por el colorante luego de la decoloración.

De esta manera, utilizando proteínas patrones de PM conocido se hace una curva de calibración graficando su porcentaje de migración en función del log PM y luego en base a la movilidad electroforética de nuestra enzima determinamos su PM.

II.8. TECNICAS PARA LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS

II.8.1. Activación de la Sepharosa 4B

La Sepharosa 4B se activó con bromuro de cianógeno (BrCN) siguiendo el procedimiento de Cuatrecasas (1970) que básicamente consiste en lo siguiente: un determinado volumen de Sepharosa decantada se mezcla con igual volumen de agua fría, colocándose el recipiente en un baño de hielo. A la Sepharosa así resuspendida se le añade BrCN y se agita constantemente. La relación de mg de BrCN por ml de gel decantado empleada varió según el caso particular y se indicará en Resultados. Con el fin de mantener el pH alrededor de $11 \pm 0,5$ (rango de pH óptimo para la reacción de activación) se agrega hidróxido de sodio 5 M. La reacción se completa una vez que el BrCN se ha disuelto totalmente, condiciones bajo las cuales el pH se estabiliza.

La Sepharosa activada se vierte sobre un Buchner frío y se lava con 20 volúmenes de buffer bicarbonato 0,1 M pH 9,8 aplicando vacío suave para evitar que el gel se seque. Esta operación debe realizarse en un período de 2 a 5 minutos.

El gel así activado sirve como punto de partida para la inmovilización de enzimas, como también para la preparación de adsorbentes bioespecíficos de la enzima, por unión covalente de su sustrato, ya sea directamente a la matriz o a través de brazos de distinta longitud.

II.8.2. Inmovilización de deaminasa de eritrocitos

La Sepharosa activada fue resuspendida en igual volumen de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8 y se le agregó la solución de enzima en el mismo buffer (15 mg proteína/ ml gel) en frío, lentamente y con agitación constante. Luego se permitió el acoplamiento dejando la mezcla a 4 °C, con suave pero continua agitación por espacio de 15 horas, al cabo de las cuales el gel acoplado se lavó 10 veces con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,1-7,2 en batch.

Como de costumbre, se mantuvo paralelamente una preparación de enzima en solución, en idénticas condiciones mecánicas.

La concentración de proteína unida a la matriz se determinó por diferencia entre la cantidad total empleada para el acople y la cantidad presente en los lavados.

CAPITULO III

REFERENCIAS

III. REFERENCIAS

- Andrews, P. (1964) *Biochem. J.* 91, 222.
- Andrews, P. (1965) *Biochem. J.* 96, 595.
- Batlle, A. (1968) *Ciencia e Investigación* 24 (6), 242.
- Batlle, A. & Grinstein, M. (1962) *Latin. Am. Meeting Chem.*, 8th Buenos Aires, Abstr., p. 107.
- Batlle, A. & Grinstein, M. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* 82, 1.
- Bradford, M. (1976) *Analytical Biochem.* 72, 248.
- Bustos, N.; Stella, A.; Wider de Xifra, E. & Batlle, A. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 745.
- Cookson, G. & Rimington, C. (1954) *Biochem. J.* 57, 476.
- Cornford, P. & Benson, A. (1963) *J. Chromatog.* 10, 141.
- Cuatrecasas, P. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 3059.
- Davies, B. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404.
- Kalckar, H. (1947) *J. Biol. Chem.* 167, 461.
- Keilin, D. & Hartree, E. (1951) *Biochem. J.* 49, 88.
- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, A. & Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Moore, D. & Labbe, R. (1964) *Clin. Chem.* 10, 1105.
- Ornstein, L. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321.
- Polo, C.; Stella, A.; Wider, E.; Batlle, A.; Lenczner, J.; Altuna, C. & Magnin, P. (1983) *Prensa Med. Arg.* 70, 433.
- Rimington, C. (1960) *Biochem. J.* 75, 260.
- Rimington, C. & Svensson, S. (1950) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2, 209.
- Sancovich, H.; Ferramola, A.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1970) en "Methods in Enzymology" (Eds. Tabor y Tabor), vol. 17, p. 220. Academic Press, New York.
- Scott, E. (1976) *Preparative Biochem.* 6, 147.
- Warburg, O. & Christian, W. (1941) *Biochem. Z.* 310, 384.

RESULTADOS Y DISCUSION

CONSIDERACIONES GENERALES

Existen numerosísimos trabajos acerca de la purificación y el estudio de las propiedades de la deaminasa o de la PBG-asa de distintas fuentes. Si bien algunos autores han purificado y caracterizado ambas enzimas provenientes de la misma fuente, como hígado vacuno (Sancovich y col., 1969 a, b), callos de soya (Llambías y Batlle, 1970, 1971 a), eritrocitos de ave (Llambías y Batlle, 1971 b; Llambías y col., 1971) y *Euglena gracilis* (Rossetti y col., 1980, 1986, 1987), no es frecuente que se investiguen extensamente ambas proteínas en forma paralela, remarcando sus semejanzas y diferencias.

El objeto del presente trabajo es estudiar la deaminasa y PBG-asa a partir de tejidos de organismos superiores, tales como hígado de cerdo y glóbulos rojos humanos, de origen no eritropoyético y eritropoyético, respectivamente. A partir de estas fuentes se aislaron, purificaron y caracterizaron ambas enzimas.

P A R T E I

DEAMINASA Y PBG-asa DE HIGADO BOVINO

CAPITULO I

AISLAMIENTO Y PURIFICACION

	Página
I.1. Aislamiento y purificación de deaminasa	129
I.1.1. Ensayos preliminares	129
I.1.2. Purificación de la deaminasa	131
I.2. Aislamiento y purificación de la PBG-asa	133
I.2.1. Estudios preliminares	133
I.2.2. Purificación de PBG-asa	136
I.3. Determinación de los pesos moleculares de la deaminasa y de la PBG-asa de hígado de cerdo	139
I.4. Estudio comparativo	139

PARTE I: DEAMINASA Y PBG-asa DE HIGADO PORCINO

I. AISLAMIENTO Y PURIFICACION

I.1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE DEAMINASA

I.1.1. Ensayos preliminares

Para el aislamiento y purificación de la deaminasa y PBG-asa de hígado porcino se siguió una metodología similar a la empleada por Sancovich y col. (1969 a) para las mismas enzimas de hígado de vaca. No obstante se realizaron algunos ensayos preliminares con el objeto de optimizar el proceso de purificación.

En primer término se investigó el uso de la diálisis y el tratamiento con ácido acético glacial como posibles etapas de purificación. Para ello, se obtuvo un homogenato de tejido hepático 10 % p/v en sacarosa 0,25 M, empleando un potter de vidrio y un émbolo de teflon. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos, obteniéndose un precipitado que se descartó y un sobrenadante, que se dializó contra agua destilada durante 24 horas; una vez finalizada la diálisis el sistema se sometió a un tratamiento con ácido acético glacial. Paralelamente, se ensayó el efecto de la precipitación ácida como etapa previa a la diálisis. Los resultados mostraron que la diálisis no purificó la deaminasa, provocando en cambio una importante pérdida de unidades enzimáticas. El tratamiento con ácido acético glacial, en cambio purificó la enzima aproximadamente dos veces. Estos resultados no concuerdan con los reportados para la deaminasa de hígado de vaca (Sancovich y col., 1969 a), callos de soya (Llambías y Batlle, 1971 a) y eritrocitos de ave (Llambías y Batlle, 1971 b), tejidos en los cuales la etapa de diálisis contra agua destilada fue efectiva en el proceso de purificación.

Una vez probada la eficacia del tratamiento ácido como etapa temprana en la purificación, se decidió establecer cuál era el rango óptimo de saturación con sulfato de amonio; para ello se realizaron precipitaciones fraccionadas dentro de los rangos 0 - 35, 35 - 55 y 55 - 70 % con dicha sal. Del análisis de los resultados surge que la mayor parte de la actividad enzimática

se halla concentrada en la fracción 35 - 55 % y que en dicha etapa la enzima se purifica aproximadamente 4 veces.

Posteriormente, se investigó el efecto de un tratamiento a altas temperaturas, que como se sabe es uno de los procedimientos más frecuentemente utilizados para la purificación de la deaminasa. El mismo consiste en someter a preparaciones enzimáticas con actividad de PBG-asa a un calentamiento a temperaturas por lo general superiores a 60 °C durante tiempos variables. De esta forma, la isomerasa que es una proteína sumamente termolábil, se destruye y se separa del complejo. Asimismo, durante este tratamiento, generalmente ocurre una activación de la deaminasa; por este motivo es que se estudió minuciosamente el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática (Tabla I.1.). Se empleó para tal fin una preparación parcialmente purificada de PBG-asa de hígado porcino (35 - 55 % de saturación con sulfato de amonio, desalada), que se calentó a diferentes temperaturas, entre 60 y 75 °C, durante períodos de tiempo variables. Es importante destacar que durante los calentamientos a 60 °C para todos los tiempos estudiados y a 65 °C para 5, 10 y 15 minutos no hay pérdida de unidades enzimáticas, no sucediendo lo mismo a las otras temperaturas y tiempos ensayados, al cabo de los cuales se detectó una significativa inactivación de la enzima.

Por otra parte, se observa que el contenido de proteínas también disminuye drásticamente, hecho que conduce en algunos casos a un incremento en la actividad específica; por lo tanto, se considera que 65 °C y 10 minutos son las condiciones óptimas de calentamiento ya que en este punto la actividad específica de la enzima aumenta aproximadamente 4 veces sin pérdida de unidades y además, se tiene un porcentaje elevado de Urogen I respecto de Urogen III. Del análisis de los datos cromatográficos surge que ni la isomerasa ni las decarboxilasas se destruyen completamente. Además, no se observa la típica activación de la deaminasa por calentamiento. Esto último no concuerda con lo reportado para las enzimas de otras fuentes (Lockwood y Benson, 1960; Cornford, 1964; Sancovich y col., 1969 a, 1976; Frydman y Frydman, 1970; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Jordan y Shemin, 1973; Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti y col., 1980; Williams y col., 1981; Kotler y col., 1987 a).

De acuerdo a lo expuesto parecería que la isomerasa de esta fuente presenta atípicamente una mayor estabilidad al

calentamiento, mientras que la deaminasa sería significativamente más sensible a dicho tratamiento en comparación con las deaminasas estudiadas hasta el momento.

TABLA I.1.: Efecto del calentamiento sobre la actividad enzimática

CALENTAMIENTO		PORFIRINAS		UNIDADES TOTALES (nmoles porf)	PROTEINAS		PORFIRINAS FORMADAS (Z)		
Temp. (°C)	Tiempo (min)	nmoles	nmoles/mg prot.		mg/ml	Totales (ug)	URO I	URO III	Decarbo xiladas
60	5	6,60	1,38	15,2	2,38	15,2	-	90	10
	10	9,57	2,06	28,7	2,30	13,8	5	85	10
	15	4,96	1,53	13,9	1,60	9,0	35	60	5
	20	5,94	1,96	16,3	1,51	8,3	35	60	5
65	5	4,66	2,58	14,0	0,90	5,4	55	45	t
	10	7,47	3,43	22,4	1,09	6,5	70	25	5
	15	4,97	2,43	15,2	1,02	6,2	75	25	t
	20	1,53	0,83	4,1	0,92	5,0	70	30	t
70	5	4,52	2,27	12,2	0,99	5,3	70	30	t
	10	2,28	1,44	6,8	0,79	4,7	70	30	t
	15	2,23	1,34	6,2	0,83	4,7	70	30	t
	20	1,07	0,86	3,0	0,62	3,5	70	30	t
75	5	2,74	2,02	7,6	0,68	3,6	80	20	-
	10	2,26	2,33	5,8	0,48	2,4	80	20	-
	15	0,70	0,61	1,9	0,57	3,0	80	20	-
	20	0,99	0,91	2,2	0,55	2,4	80	20	-
Control		5,88	0,83	20,6	3,54	24,8	-	95	5

Se incubaron los sobrenadantes provenientes de los diferentes tratamientos; según se indica en la Tabla. Como control se empleó la fracción 35 - 55 % de saturación con sulfato de amonio convenientemente desalada. El sistema de incubación y el resto de la metodología fueron los usuales. t: trazas.

I.1.2. Purificación de la deaminasa

Con el objeto de purificar la deaminasa de hígado de cerdo se agregó como etapa posterior al calentamiento un pasaje a través de una columna de Sephadex G-100. Los pasos de purificación resultantes, los cuales, con excepción del calentamiento se realizaron a 4 °C, se describen a continuación:

Etapa 1: Homogenato: se realizó un homogenato del tejido hepático, previamente lavado con solución fisiológica, en sacarosa 0,25 M (10 % p/v).

Etapa 2: Sobrenadante: el homogenato se centrifugó a 10.000 x g por 20 minutos y el pellet se descartó.

Etapa 3: Tratamiento ácido: el sobrenadante se llevó a pH 5 por lento agregado de ácido acético glacial con agitación constante. La mezcla se dejó en esas condiciones durante 30 minutos más y finalmente se centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos descartándose la fracción precipitada.

Etapa 4: Fraccionamiento salino: la solución sobrenadante proveniente de la etapa anterior se fraccionó con sulfato de amonio, manteniéndose el pH alrededor de 7 por medio del agregado de amoníaco concentrado. Se precipió la fracción 35 - 55 % y se separó por centrifugación a 10.000 x g durante 15 minutos, descartándose la solución sobrenadante. La fracción así obtenida es estable por 40 días estacionada a - 20 °C.

Etapa 5: Calentamiento: la proteína proveniente de la etapa previa se desaló por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25 grueso. Es indispensable realizar este paso de eliminación de iones amonio pues se sabe que el agregado de dichos cationes protege a la isomerasa de su inactivación térmica en un 80 - 100 % (Llambías & Batlle, 1971 a, b; Sancovich y col., 1976). Finalmente, la preparación enzimática se calentó a 65 °C por 10 minutos con agitación constante, se enfrió luego en baño de hielo y centrifugó a 10.000 x g durante 15 minutos. La solución sobrenadante conteniendo la enzima se concentró a 55 % de saturación con sulfato de amonio sólido.

Etapa 6: Cromatografía en Sephadex G-100: la solución proteica concentrada se suspendió en un pequeño volumen de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 y se sembró en una columna de Sephadex G-100. La Figura I.1. muestra el perfil de elución típico. Se observa que la actividad enzimática eluye luego del pool proteico, resultando así una preparación enzimática purificada 4 veces en esta etapa.

El cuadro de purificación completo se detalla en la Tabla I.2. Se observa que las etapas de fraccionamiento salino, calentamiento y cromatografía a través de Sephadex G-100 purifican a la enzima alrededor de 4 veces cada una. Es importante señalar que recién después del calentamiento se elimina la mayor parte de isomerasa. Finalmente destacaremos que el grado de purificación total alcanzado es aceptable (150 veces) y como

veremos a continuación cuatro veces superior al obtenido para la PBG-asa de la misma fuente.

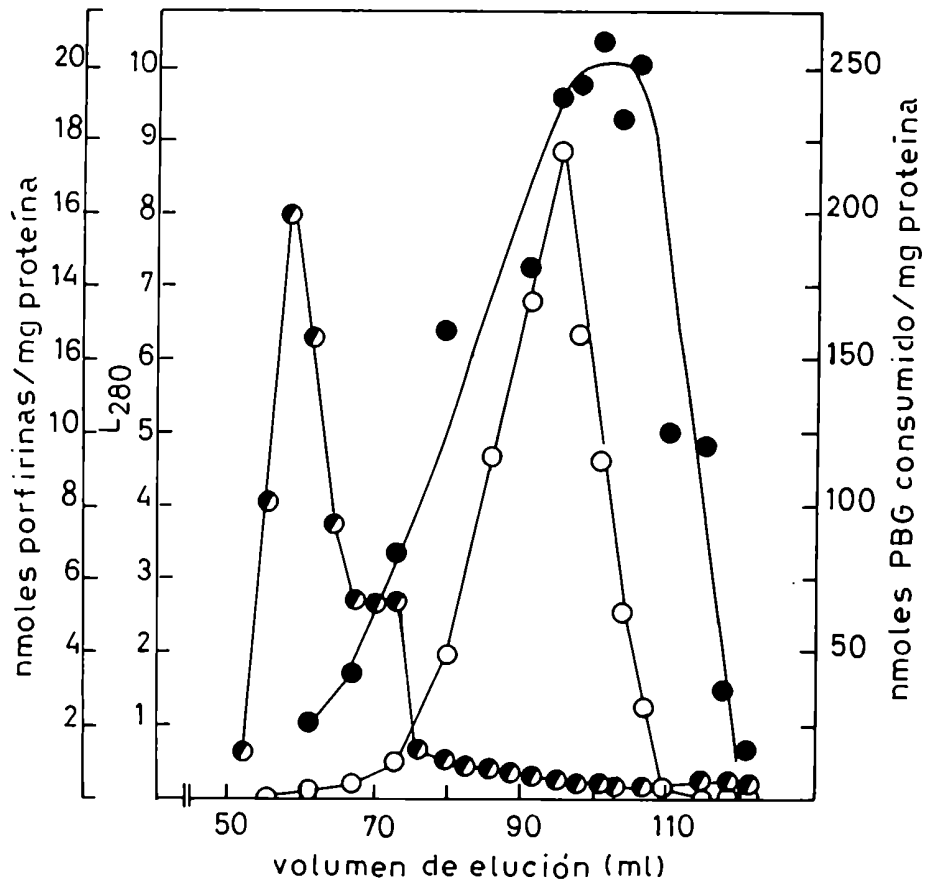


FIGURA I.1.: Perfil de elución de la deaminasa de hígado porcino a través de Sephadex G-100 (Etapa 6). La proteína se eluyó empleando buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. En los eluidos de la columna se determinó: contenido proteico (●) y actividad específica según las porfirinas formadas (○) y el PBG consumido (●). El sistema de incubación y la metodología empleados fueron los descritos en el texto.

I.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA PBG-asa

I.2.1. Estudios preliminares

En la purificación de la PBG-asa de hígado porcino se emplearon etapas análogas a las descritas para la deaminasa de

esta fuente, salvo obviamente el paso de calentamiento. Sin embargo, teniendo en cuenta que Sancovich y col. (1969 a) emplearon el tratamiento con geles de fosfato de calcio en la purificación de la PBG-asa de hígado vacuno, se investigó la posibilidad de incluir ese tratamiento en esta secuencia. Este proceso se basa en la capacidad de adsorción de nucleoproteínas por los geles de fosfato de calcio, que no son más que una mezcla de fosfatos cálcicos precipitados bajo la forma de coágulos gelatinosos (Keilin y Hartree, 1951). Desde el punto de vista operativo, el mecanismo es el siguiente: a la fracción 35 - 55 % de saturación previamente desalada, en frío y con agitación constante, se agrega el gel lentamente en la relación mg proteína/mg gel más conveniente. Posteriormente, con el objeto de asegurar el contacto entre el gel y la proteína, se deja en agitación durante 10 minutos más; al cabo de este tiempo se centrifuga a 7.000 x g 10 minutos. Bajo estas condiciones, la proteína puede quedar adsorbida o no en el gel; en el primer caso se deben realizar uno o dos lavados sucesivos con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,6-7,8 al cual se le agrega cloruro de sodio 0,1 M para aumentar la fuerza iónica y facilitar la desadsorción. Durante el transcurso de estos estudios se empleó en primer lugar un gel con más de un año de estacionamiento en diferentes relaciones mg proteína/mg gel (1:2; 1:1; 1:0,75 y 1:0,5). No obstante los hallazgos de Sancovich y col. (1969 a), los resultados mostraron en este caso una pérdida apreciable no sólo de unidades enzimáticas sino también de proteínas, tanto en el sobrenadante de la centrifugación como en los lavados. La pérdida de unidades se puede explicar considerando que la enzima quedó adsorbida al gel y no se logró desprender, o bien se inactivó durante el tratamiento. Sin embargo, la pérdida de proteínas no es fácil de explicar pues tratando el gel con soluciones de fuerzas iónicas muy superiores a 0,1 M de cloruro de sodio, no hubo recuperación adicional de proteínas.

Descartando entonces, la posibilidad de que ninguna de las relaciones estudiadas fuera la óptima, quedaba la alternativa de que el gel no hubiese sido efectivo por haber perdido sus propiedades adsorbentes con el tiempo de estacionamiento, por razones no determinadas. Por este motivo, se prepararon 3 nuevos lotes de geles, que se diferenciaban entre sí solamente en la forma en que se mezclaron los reactivos durante la preparación; antes

de su empleo se los dejó estacionar durante 45 días. La variación en la forma de mezclado tuvo por objeto modificar el tamaño de la partícula coloidal, ya que resultaba llamativo que las proteínas no se hubieran desadsorbido aún con las elevadísimas fuerzas iónicas utilizadas. De esta manera, se estudiaron nuevamente tres relaciones mg proteína/mg gel (1:2; 1:1; 1:0,5), obteniéndose en todos los casos, resultados análogos a los anteriores.

TABLA I.2.: Cuadro de purificación de la deaminasa de hígado porcino

ETAPA	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmoles/mg prot.)	UNIDADES TOTALES (nmoles)	PROTEINAS TOTALES (mg)	GRADO DE PURIFICACION TOTAL	PORFIRINAS FORMADAS (%)		
					URO I	URO III	Decarboxiladas
1. Homogenato	0,09	290,8	3.404	1,0	-		
2. Sobrenadante		227,2	1.743		-		
3. Trat.		202,3	997		-		
4. Fraccionamiento salino			261		-	95	5
5. Calentamiento		197,2			80	20	c
6. Cromatografía en Sephadex G-100	13,34*	113,9	45	148,2*	90*	10*	

(*) Estos datos corresponden al pico de actividad cuyo volumen de elución fue de 95 ml.

La obtención de las diferentes fracciones, el sistema de incubación y el resto de la metodología empleada se describen en el texto. Los datos cromatográficos correspondientes a las etapas 1, 2 y 3 no se muestran pues las porfirinas estaban contaminadas con una sustancia grasa, amarillenta, que fue imposible eliminar e impidió las corridas cromatográficas

Una vez descartado el tratamiento con los geles de fosfato, se ensayó como método de purificación el efecto del sulfato de protamina sobre la fracción 35 - 55 % de saturación, previamente desalada por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25 grueso. La solución de sulfato de protamina se agrega lentamente, con agitación constante y en frío; al finalizar la adición se deja en esas mismas condiciones durante 10 minutos,

asegurándose así un buen contacto de la enzima con el sulfato de protamina. Al cabo de ese tiempo se centrifuga a 7.000 x g durante 10 minutos. De esta centrifugación resulta un sobrenadante y un precipitado que se descarta. En este ensayo se estudiaron las relaciones 0,005; 0,010; 0,015; 0,020 y 0,025 ml de solución 2 % de sulfato de protamina/mg proteína, seleccionadas en base a experiencias anteriores de nuestro laboratorio. Los resultados fueron similares a los obtenidos con el gel de fosfato de calcio, o sea, una pérdida casi total de unidades y proteínas.

Evidentemente, ni el sulfato de protamina ni el gel de fosfato de calcio pueden emplearse, de modo alguno, como etapas de purificación para la PBG-asa de hígado de cerdo.

I.2.2. Purificación de PBG-asa

Luego de los ensayos preliminares, la secuencia de pasos finalmente empleada es la que se detalla a continuación; todas las operaciones se realizaron a 4 °C.

Etapa 1: Homogenato: se preparó un homogenato al 10 % p/v en sacarosa 0,25 M.

Etapa 2: Sobrenadante: se centrifugó a 10.000 x g durante 20 minutos obteniéndose un precipitado que se descartó y el correspondiente sobrenadante.

Etapa 3: Tratamiento ácido: El sobrenadante de la etapa anterior se trató con ácido acético glacial, el cual se agregó lentamente con agitación constante y en frío, hasta llegar a pH 5. La mezcla se dejó agitando por un espacio adicional de 30 minutos y luego se centrifugó durante 10 minutos a 11.000 x g obteniéndose un nuevo sobrenadante y un pellet que se descartó.

Etapa 4: Fraccionamiento salino: Al sobrenadante proveniente del tratamiento ácido se le realizó un fraccionamiento con sulfato de amonio, recogiendo la fracción 35 - 55 % de saturación. Para la medición de la actividad enzimática esta fracción se desaló por pasaje a través de Sephadex G-25 grueso.

Etapa 5: Cromatografía en Sephadex G-100: El precipitado salino proteico resuspendido en un pequeño volumen de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,6 - 7,8 se sembró en una columna de Sephadex G-100 equilibrada previamente con el mismo buffer. En la Figura

I.2. se muestra el perfil de elución característico. Se observa una banda de actividad bien definida (pico 1) que eluye después del pool proteico y aparece además, un pequeño hombro (2), cuya contribución es poco significativa, razón por la cual no se lo tuvo en cuenta.

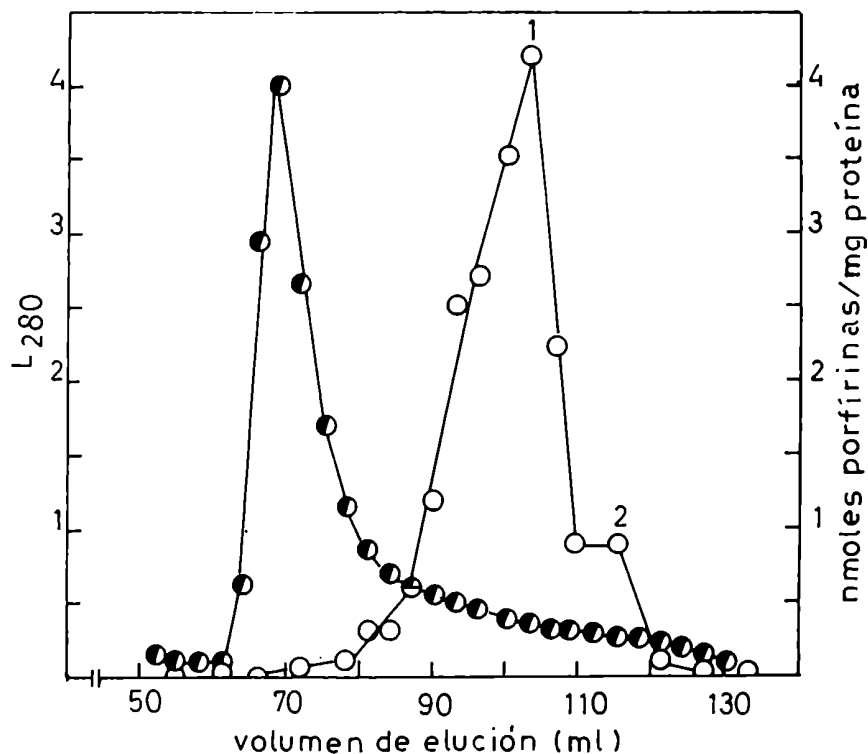


FIGURA I.2.: Perfil de elución de la PBG-asa de hígado porcino a través de Sephadex G-100.

La proteína se eluyó empleando buffer Tris-HCl pH 7,6 - 7,8. En los eluidos de la columna se determinó: contenido proteico (●) y actividad específica (nmoles porfirinas/mg proteína) (○). El sistema de incubación y la metodología empleada fueron los descritos en el texto.

En la Tabla I.3. se muestran los resultados de la purificación, en ella se observa que el paso que purifica más veces es la cromatografía por Sephadex G-100, en tanto que el grado de purificación total es tan solo de 35 veces. De todas maneras, el procedimiento es sumamente reproducible, obteniéndose siempre

una purificación del mismo orden.

TABLA I.3.: Cuadro de purificación de la PBG-asa de hígado porcino

ETAPA	ACTIVIDAD ESPECÍFICA (nmoles porf/mg)	UNIDADES TOTALES (nmoles)	PROTEÍNAS TOTALES (mg)	PURIFICACION TOTAL	PORFIRINAS FORMADAS (X)		
					URO I	URO III	Decarboxiladas
1. Homogenato	0,12	74,2	605	1,0			
2. Sobrenadante	0,16	91,4	255	3,0			
3. Tratamiento ácido	0,55	85,6	157	4,6	-		
4. Fraccionamiento salino		51,9				30	
5. Cromatografía en Sephadex G-100						95*	

(*) Estos datos corresponden al pico 1 de actividad (Figura I.2) La obtención de las diferentes fracciones, el sistema de incubación y el resto de la metodología empleada se describen en el texto. Los datos cromatográficos correspondientes a las etapas 1, 2 y 3 no se muestran por la misma razón explicada en la Tabla I.2.

Finalmente, señalaremos que en los datos cromatográficos correspondientes al fraccionamiento salino (Tabla I.3.) se observa un gran porcentaje de porfirinas decarboxiladas, en comparación con los resultados de la fracción análoga de la Tabla I.2. Este hecho podría deberse a la atmósfera de incubación empleada en ambos casos, la cual es aeróbica para la deaminasa y anaeróbica para la PBG-asa; de este modo la actividad de las decarboxilasas, que funcionan de manera estrictamente anaeróbica, se vería favorecida en el segundo caso, apareciendo así mayor cantidad de porfirinas decarboxiladas.

I.3. DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES DE LA DEAMINASA Y DE LA PBG-asa DE HIGADO DE CERDO

Se determinaron los PM's de ambas enzimas empleando cromatografía en Sephadex G-100 y electroforesis en geles de poli(acrilamida).

La estimación del tamaño molecular de la deaminasa de hígado porcino, obtenida en base a la cromatografía sobre Sephadex G-100, condujo a un PM de 40.000 ± 4.000 daltons, el cual corresponde al pico de actividad enzimática de la Figura I.1. Asimismo, con esta misma técnica se obtuvo un PM de 50.000 ± 5.000 daltons para la PBG-asa de esta misma fuente (Figura I.2., pico 1).

Por otra parte, las preparaciones enzimáticas conteniendo deaminasa y PBG-asa sometidas a electroforesis en geles de poli(acrilamida), se separaron en varias bandas proteicas, de las cuales solamente una mostró actividad enzimática. El PM estimativo de estas proteínas activas fue cercano a 40.000 para la deaminasa y de alrededor de 50.000 para el complejo PBG-asa.

I.4. ESTUDIO COMPARATIVO

En la Tabla I.4. presentamos una recopilación de datos obtenidos de diversas publicaciones, en las que los autores estudiaron la deaminasa y PBG-asa de distintas fuentes. En general, se observa una gran coincidencia en los PM's de la deaminasa, que en la mayoría de los casos están en el orden de los 40.000 D, aunque se han detectado pesos moleculares menores (20.000) para la enzima de *Euglena gracilis* y mayores (74.000) en *Rp. palustris*. En cambio para la PBG-asa los PM's hallados abarcan un rango que va desde 25.000 hasta aproximadamente 100.000 daltons, si bien predomina el de 50.000. Ya en 1980, Rossetti y col. llamaron la atención acerca de la diversidad en los valores de PM hallados para la PBG-asa, señalando que la enzima podría existir en tres especies moleculares diferentes, tetrámero, dímero y monómero, de acuerdo a la fuente. Estos autores sugirieron además, que en algunos organismos el monómero sería la especie activa, como ocurre en callos de soya; mientras que en otros, sería necesaria la adición de dos o cuatro unidades protoméricas para que

la actividad se manifestara.

TABLA I.4.: Datos comparativos

FUENTE	PESO MOLECULAR		GRADO DE PURIFICACION TOTAL		REFERENCIAS
	PBG-asa	Deaminasa	PBG-asa	Deaminasa	
Hígado vacuno	50.000	40.000	182	334	Sancovich y col. (1969 a)
Eritrocitos de ave	100.000	40.000	4.910	8.550	Llambías y Batlle (1971 b)
Callos de soya	25.000	40.000	73	150	Llambías y Batlle (1971 a)
<i>Euglena</i> * <i>gracilis</i> (soluble)	50.000 (25.000)		711		Rossetti y col. (1986)
		40.000 (20.000)		1.222	Rossetti (1978)
<i>Euglena</i> * <i>gracilis</i> (particulada)	50.000 (25.000)	40.000 (20.000)	539	1.200	Rossetti (1978)
<i>Rp. palustris</i>	115.000 (50.000)		22		Juknat y col. (1988 a)
		74.000		72	Kotler y col. (1987 a)
Hígado porcino	50.000	40.000	36	148	Fumagalli (1988) Tesis Doctoral (UBA)

(*) *Euglena gracilis* soluble se refiere a las enzimas contenidas en las fracciones celulares solubles, mientras que la *Euglena gracilis* particulada se refiere a las enzimas contenidas en las fracciones no solubles y que sólo se desprenden de las membranas mediante la acción de agentes caotrópicos.

Los datos de PM's entre paréntesis corresponden a especies proteicas presentes en menor cantidad y que poseen actividad de deaminasa o de PBG-asa según sea el caso.

Respecto al grado de purificación, observamos también

una gran variación, si bien la deaminasa se purifica en todos los casos aproximadamente 2 veces más que la PBG-asa. Este hecho se explica muy fácilmente ya que esta enzima es mucho más resistente que la isomerasa a los tratamientos físicos empleados durante la purificación.

CAPITULO II

PROPIEDADES Y ESTUDIOS CINETICOS

	Página
II.1. Efecto de la atmósfera de incubación sobre la actividad enzimática	142
II.2. Efecto de la concentración de enzima sobre la actividad	144
II.3. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática	144
II.4. Determinación del pH óptimo de la reacción	145
II.5. Estudios cinéticos	145
II.6. Estequiometría de la reacción	152
II.7. Estudio cinético comparativo	157

II. PROPIEDADES Y ESTUDIOS CINETICOS

II.1. EFEECTO DE LA ATMOSFERA DE INCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

Si bien se acepta que la condensación enzimática de PBG a uroporfirinógenos debería ser un proceso anaeróbico (Llambías y Batlle, 1971 a y citas allí presentadas), en algunos tejidos se comprobó que la PBG-asa y la deaminasa son activas tanto en ausencia como en presencia de oxígeno (Bogorad, 1958 a, b; Lockwood y Benson, 1960; Sancovich y col., 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 b; Araujo y col., 1987).

Llambías y Batlle (1971 a) investigando las enzimas de callos de soya y Rossetti y Batlle (1977) estudiando las de *Euglena gracilis*, encontraron que la aerobiosis afectaba seriamente la actividad. En estas últimas fuentes la formación de porfirinas es mucho mayor en anaerobiosis, aunque el consumo de PBG no se modifica por la presencia de oxígeno. En base a estos resultados se sugirió que la atmósfera aeróbica no impide la formación de intermediarios, pero que el oxígeno podría oxidarlos, evitando así su posterior conversión en porfirinas (Batlle y Rossetti, 1977).

Alternativamente, Stella y col. (1971) propusieron que el oxígeno podría modificar la enzima por oxidación de algún grupo reactivo esencial como por ejemplo tioles, bloqueando así la formación de intermediarios normales o la etapa final de ciclización.

El hecho de que el consumo de sustrato no se halle afectado en condiciones aeróbicas podría explicarse también por desviación del PBG hacia un camino metabólico diferente de la formación de porfirinas, tal como sería el de la vía de la pirrol oxigenasa (Frydman y col., 1972); o bien, por una oxidación enzimática del sustrato (Bogorad, 1958 b).

De acuerdo a lo expuesto, se consideró interesante examinar el efecto de la atmósfera de incubación sobre la actividad de las enzimas de hígado porcino. En la Tabla II.1. se muestran los resultados correspondientes a la actividad de la deaminasa y la PBG-asa. Para la primer enzima no se detectó variación en la

actividad específica expresada en base al producto formado o sustrato consumido; de manera que la deaminasa de hígado porcino es igualmente activa en ambas atmósferas, como se vió que ocurría con la misma enzima de hígado vacuno (Sancovich y col., 1969 a). Sucede algo análogo con la PBG-asa, si bien en este caso se observa un incremento significativo del tipo isomérico I en aerobiosis, acompañado de una inhibición de las decarboxilasas, explicable por el hecho de que la velocidad de decarboxilación del Urogen I es mucho menor que la del Urogen III (Cornford, 1964). Según estos hallazgos la atmósfera anaeróbica es la más conveniente para la determinación de la actividad de la PBG-asa porcina, mientras que por razones prácticas se ha de emplear la aeróbica para la deaminasa.

TABLA II.1.: Efecto de la atmósfera de incubación sobre la actividad enzimática

ENZIMA	ATMOSFERA	PORFIRINAS (nmoles)	PBG CONSUMIDO (nmoles)	ACTIVIDAD ESPECIFICA		PORFIRINAS FORMADAS (%)		
				nmoles porf/mg	nmoles PBG cons/mg	URO I	URO III	Decarboxiladas
Deaminasa	Anaeróbica		141,6	1,08	44,8	70	30	
	Aeróbica		133,2			70	30	
PBG-asa		4,81	148,2		42,0	10	20	70
	Aeróbica		149,1		42,0	70	20	10

Se utilizaron como preparaciones enzimáticas el sobrenadante proveniente de la etapa de calentamiento (1,58 mg proteína/ml) y la fracción 35 - 55% de saturación con sulfato de amonio convenientemente desalada (8,91 mg proteína/ml) para la deaminasa y PBG-asa respectivamente. La mezcla de incubación fue la usual, incubándose en anaerobiosis o aerobiosis, según se indique, por espacio de 2 horas. El resto de la metodología empleada es la descripta en el texto.

II.2. EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA SOBRE LA ACTIVIDAD

El estudio del efecto de la concentración proteica sobre la actividad enzimática (Sancovich y col., 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Araujo y col., 1987; Kotler y col., 1987 a; Rossetti y col., 1987) ha demostrado que en todos los casos hay respuesta lineal con el aumento de la cantidad de enzima.

Los resultados obtenidos con la deaminasa (Figura II.1.A) y la PBG-asa (Figura II.1.B) de hígado de cerdo también muestran en una primera fase un incremento lineal de las porfirinas formadas con la cantidad de proteína pero a concentraciones mayores no se produjeron aumentos proporcionales en la formación de producto; esta desviación de la linealidad podría atribuirse a que el PBG se encontrara en concentración limitante.

Es importante notar, en último término, que ambas enzimas presentaron perfiles similares de formación de porfirinas y consumo de PBG al aumentar la concentración proteica.

II.3. EFFECTO DEL TIEMPO DE INCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

En 1971, Llambías y Batlle (a) encontraron para la deaminasa y la PBG-asa de callos de soya una fase lag prolongada, de 3 - 4 horas, al estudiar la variación de la actividad enzimática con el tiempo de incubación. Unos años más tarde, Rossetti y Batlle (1977) observaron un comportamiento similar para las mismas enzimas de *Euglena gracilis*, si bien en este caso el lag fue de aproximadamente 60 minutos. Estos hallazgos apoyaron la hipótesis acerca de la formación de intermediarios polipirrólicos y constituyeron la base de experiencias realizadas por nuestro grupo que produjeron interesantes resultados. Con estos antecedentes se decidió obviamente estudiar el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de deaminasa y PBG-asa de hígado de cerdo (Figura II.2.). Los resultados muestran perfiles similares para la formación de producto y el consumo de PBG, no evidenciándose sin embargo la presencia de un lag. Asimismo, se observa una pendiente inicial significativamente más pronunciada para la desaparición de sustrato, la cual sugeriría que ocurre un rápido consumo de PBG, que debe emplearse en la

formación de intermediarios polipirrólicos, que luego dan lugar a una producción lineal y constante de porfirinas. Estos resultados concuerdan con los hallados por Sancovich y col. (1969 a), Llambías y Batlle (1971 b y citas allí especificadas), Araujo y col. (1987) y Kotler y col. (1987 a).

Finalmente señalaremos que el tipo isomérico de las porfirinas formadas por la PBG-asa se modificó notablemente en función del tiempo de incubación, aumentando el isómero I a expensas del III hasta alcanzar un 80 % de Urogen I para el mayor tiempo ensayado. Este hecho se debe, evidentemente, a que períodos de incubación prolongados inactivan la isomerasa, que como sabemos es una enzima mucho más lábil que la deaminasa.

II.4. DETERMINACION DEL pH OPTIMO DE LA REACCION

En la Figura II.3. se representa la actividad enzimática de la deaminasa (Figura II.3.A) y la PBG-asa (Figura II.3.B) en función del pH. Se observa que el pH óptimo se alcanza empleando buffer Tris-HCl 0,05 M en ambos casos, si bien, éste es de 7,4 para la deaminasa y de 7,6 - 7,8 para la PBG-asa.

La formación de producto en presencia de buffer fosfato de sodio y glicina es mucho menor.

Es necesario destacar que el consumo de sustrato también presentó un pico único coincidente con el correspondiente a la formación de producto.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Sancovich y col. (1969 a) para ambas enzimas de hígado de vaca y se encuentran en el rango de pH's dentro del cual se ubican los pH's óptimos hallados para las enzimas de diferentes fuentes.

II.5. ESTUDIOS CINETICOS

Desde el punto de vista cinético la deaminasa de diferentes fuentes se comporta, en general, como una enzima típicamente michaeliana; no obstante, Llambías y Batlle (1971 a) encontraron que en callos de soya presentaba una cooperatividad positiva.

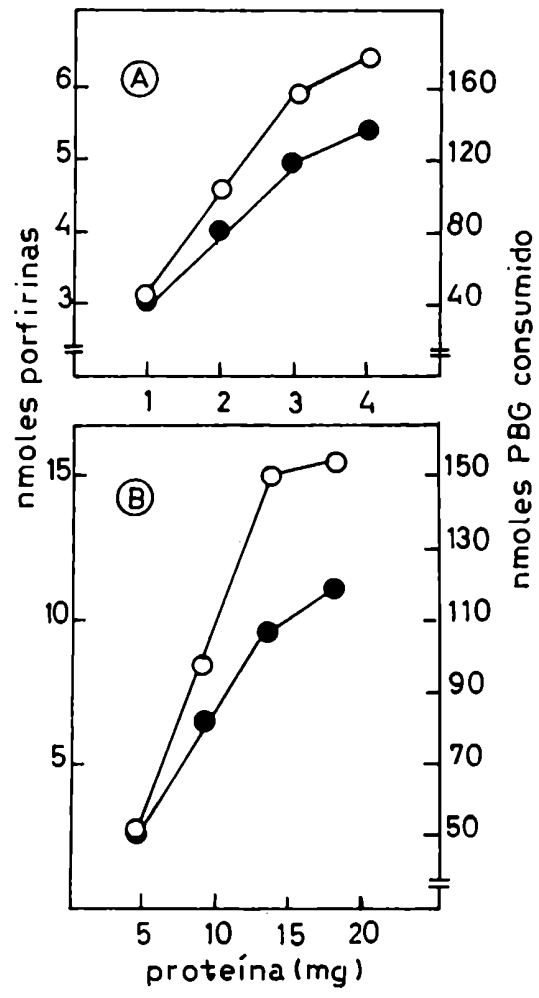


FIGURA II.1.:

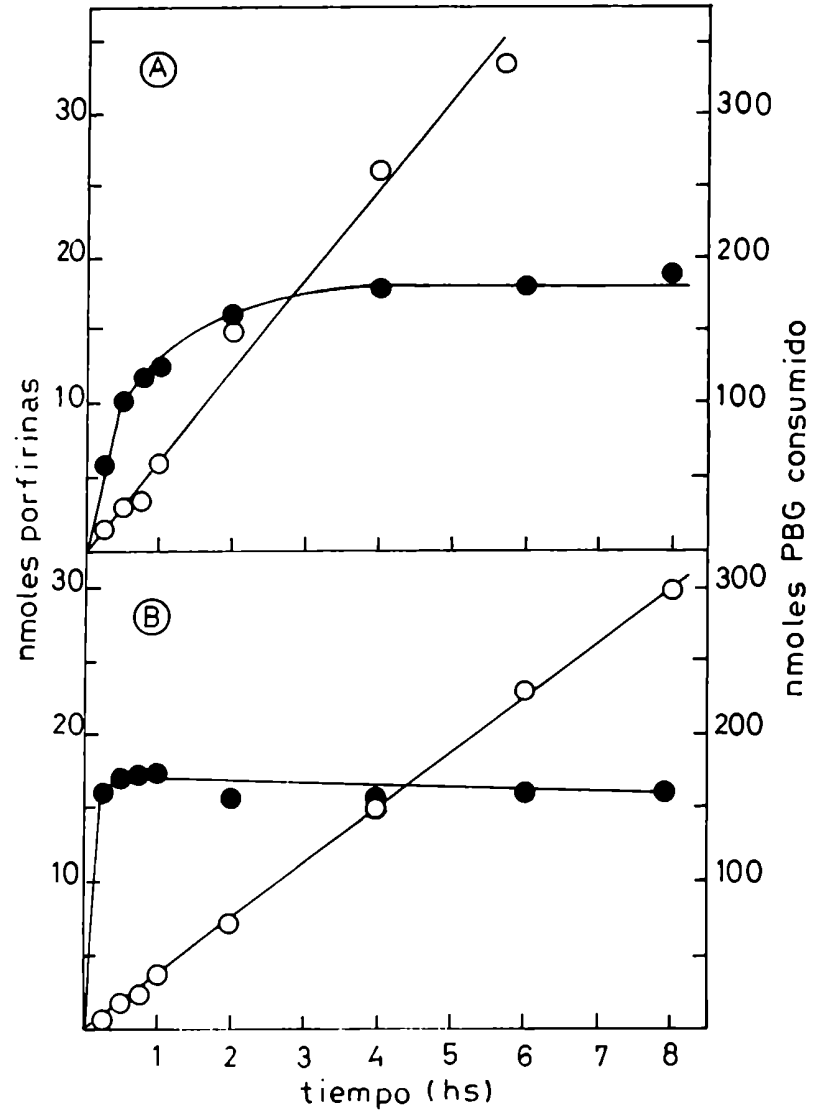


FIGURA II.2.: Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática. Se empleó como fuente de deaminasa (A) la fracción proveniente del calentamiento y como preparación enzimática conteniendo PBG-asa (B), la 35-55% de saturación desalada, las cuáles contenían 2,51 y 4,03 mg de proteína/ml respectivamente. La mezcla y condiciones de incubación utilizadas fueron las usuales, salvo por el hecho de que el período de incubación fue variable. El resto de la metodología empleada fue la descrita en Materiales y Métodos.
(○) porfirinas formadas; (●) sustrato consumido.

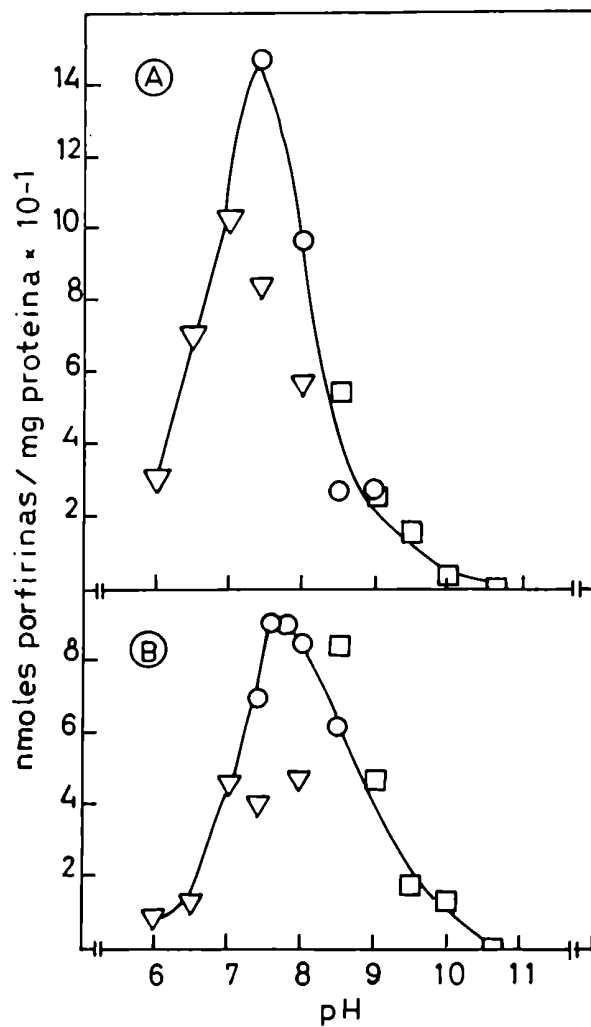


FIGURA II.3.:

pH óptimo.
 Se incubó deaminasa (A) y PBC-asa (B) de hígado porcino con PBC en un medio buffereado con : buffer fosfato de sodio (∇), Tris-HCl (\circ) y glicina (\square) todos de igual concentración (0,05 M) y diferente pH según se indica.
 Las preparaciones enzimáticas empleadas fueron sobrenadante de calentamiento y 35-55 % de saturación con sulfato de amonio como fuente de deaminasa y PBC-asa respectivamente. Los resultados cromatográficos no mostraron variación con el pH o el buffer y fueron los siguientes: 80 % de URO I y 20 % de URO III en (A) y 15 % de URO I, 5 % de URO III y 80 % de porfirinas de carboxiladas en (B). El resto de la metodología es la usual.

Por su parte la PBG-asa tiene un comportamiento cinético variable ya que mostró cooperatividad positiva en hígado bovino (Sancovich y col., 1969 a, b), eritrocitos de ave (Llambías y Batlle, 1971 b) y *Rp. palustris* (Juknat, 1983); cooperatividad negativa en callos de soya (Llambías y Batlle, 1971 a) y comportamiento michaeliano en *Euglena gracilis* particulada (Rossetti y col., 1987) y *S. cerevisiae* (Araujo y col., 1987).

Resultó entonces de interés investigar la cinética de ambas enzimas en hígado porcino.

En la Figura II.4. se muestra la gráfica de Michaelis-Menten para la deaminasa porcina. En ella se observa una curva típicamente michaeliano ya sea en base al sustrato consumido o al producto formado. De la gráfica de las inversas (Figura II.5.) se obtienen los siguientes parámetros cinéticos:

$V_{max} = 1,78$ nmoles/h y $K_m = 10,0 \times 10^{-6}$ M según las porfirinas formadas. Se observa además un trazado claramente lineal lo cual descarta la existencia de algún tipo de cooperatividad. En el inset de la misma figura se muestra el gráfico de Hill a partir del cual se determinó el n de Hill que es cercano a 1 tanto para el producto formado como para el sustrato consumido. De acuerdo a lo anteriormente expuesto podemos concluir que la deaminasa de hígado porcino presenta un comportamiento típicamente michaeliano, al igual que la misma enzima de otras fuentes (Sancovich y col., 1969 a, b.; Frydman y Frydman, 1970; Llambía y Batlle, 1971 b; Jordan y Sehmin, 1973; Frydman y Feinstein, 1974; Williams y col., 1981; Kotler y col., 1987 b).

Similarmente, se investigó la cinética de la PBG-asa porcina (Figuras II.6 y II.7.), obteniéndose nuevamente gráficos michaelianos y representaciones de Lineweaver-Burk lineales, tanto para las porfirinas formadas como para el sustrato consumido. Además se determinaron los n de Hill, los cuales tendieron a uno en ambos casos (Figura II.7., inset), resultados análogos a los encontrados para la enzima de *S. cerevisiae* (Araujo y col., 1987).

A partir de la representación de las inversas se calcularon los valores de V_{max} y K_m para este complejo enzimático, los cuales son de 12,5 nmoles porfirinas/h y 167×10^{-6} M en base al producto formado.

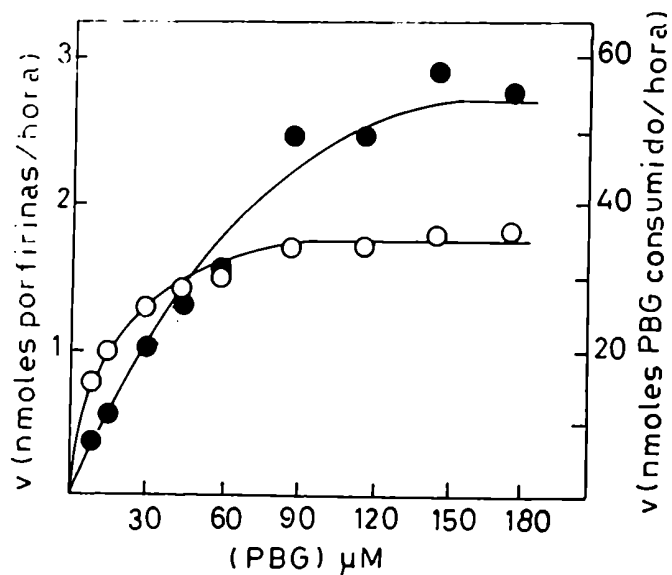


FIGURA II.4.: Gráfico de Michaelis-Menten para la deaminasa.

Se empleó la fracción proveniente del calentamiento (1,00 mg proteína/ml). El sistema de incubación contenía: 2 ml de preparación enzimática, cantidades variables de PBG y buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 hasta alcanzar un volumen final de 3 ml. Se incubó en aerobiosis por 2 horas. El resto de la metodología fue la usual.

(○) porfirinas formadas; (●) sustrato consumido.

Con el objeto de detectar pequeñas desviaciones del comportamiento michaeliano, se realizaron también las representaciones de Eadie (velocidad/(PBG) vs v) que son mucho más sensibles que los gráficos cinéticos usuales (Hensley y col., 1981). Estas representaciones dan perfiles lineales para enzimas michaelianas y tienen forma de campana cuando ocurren efectos homotrópicos. Las Figuras II.8. y II.9. muestran los resultados hallados para

la deaminasa y PBG-asa, respectivamente. En ambos casos, se observa una tendencia a la linealidad, a pesar de la gran dispersión de datos. Estos últimos resultados corroboran el comportamiento michaeliano de la deaminasa y sugieren que el complejo de la PBG-asa porcina, también exhibiría una cinética clásica michaeliana.

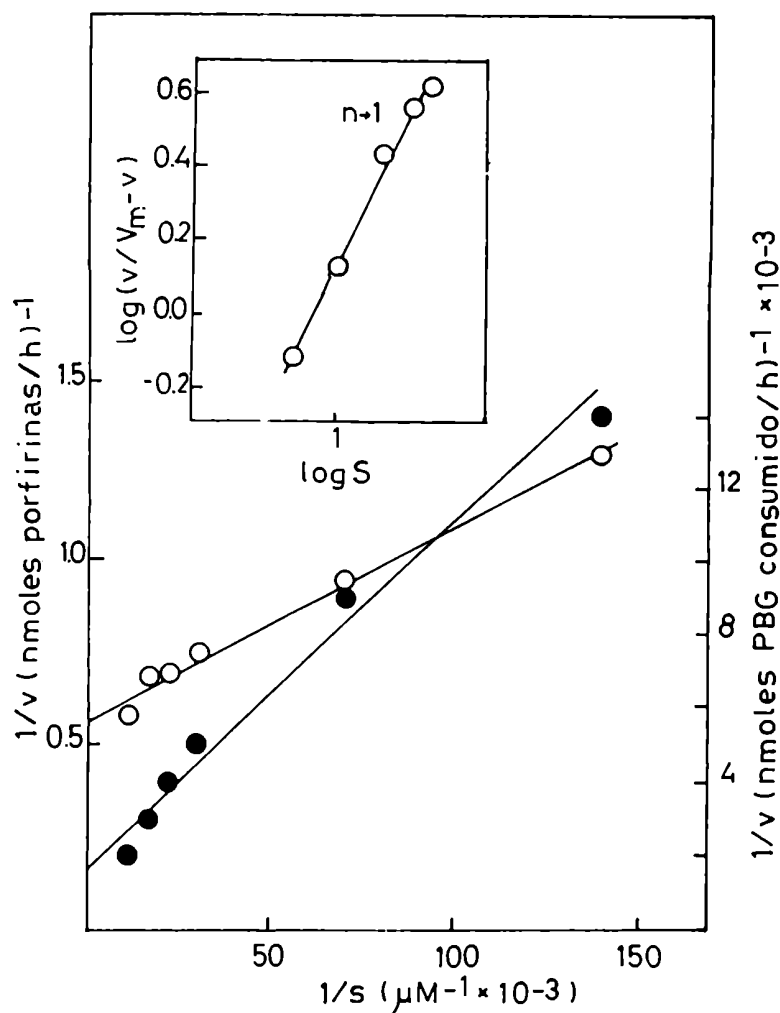


FIGURA II.5.: Gráfico de las inversas de Lineweaver-Burk. Las condiciones experimentales se detallan en la leyenda de la Figura II.4. En el inset se grafica el $\log(v/(V_{\text{max}}-v))$ vs $\log(S)$, estimando V_{max} a partir del gráfico de las inversas.

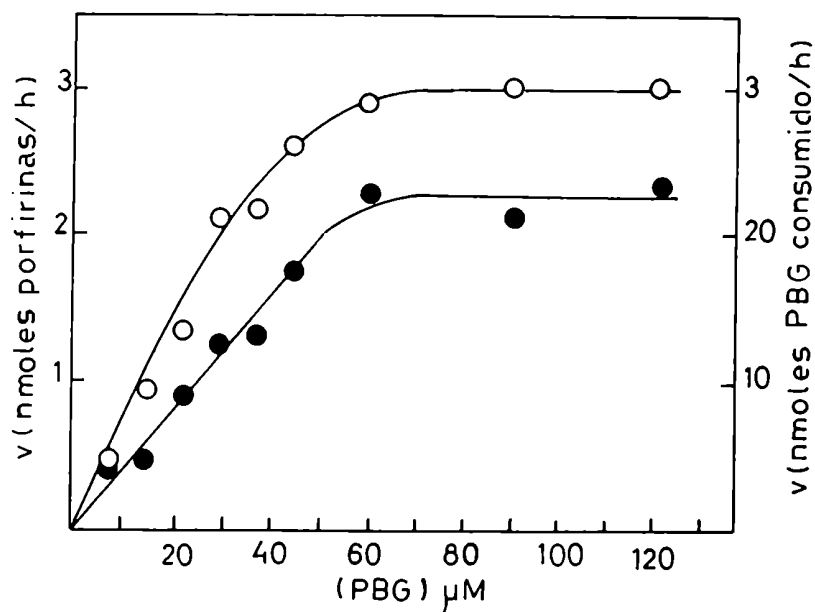


FIGURA II.6.: Gráfico de Michaelis-Menten para la PBG-asa. Se empleó la fracción proveniente del fraccionamiento salino (5,0 mg proteína/ml). El sistema de incubación contenía: 2 ml de preparación enzimática, con concentraciones variables de PBG y buffer hasta completar un volumen final de 3 ml. Se incubó en anaerobiosis por 2 horas. El resto de la metodología y condiciones de incubación fueron las usuales. (○) producto formado; (●) sustrato consumido.

II.6. ESTEQUIOMETRIA DE LA REACCION

Williams y col. (1981) trabajando con deaminasa de *Euglena gracilis*, demostraron que 4 moléculas de PBG forman una molécula de URO I con eliminación de 4 moléculas de amoníaco y según los autores esta estequiometría se cumple a diferentes valores de pH. Si bien esta estequiometría estaría de acuerdo con lo esperado teóricamente y sería lógico encontrarla para las enzimas de distintas fuentes, los estudios llevados a cabo con la PBG-asa de callos de soya (Llambías y Batlle, 1971), *Euglena gracilis* (Rossetti, 1978) y con PBG-asa y deaminasa de *Rp. palustris*

(Juknat, 1983; Kotler y col., 1987 b) indicaron que en estos casos la estequiometría de la reacción se apartaba significativamente del valor teórico.

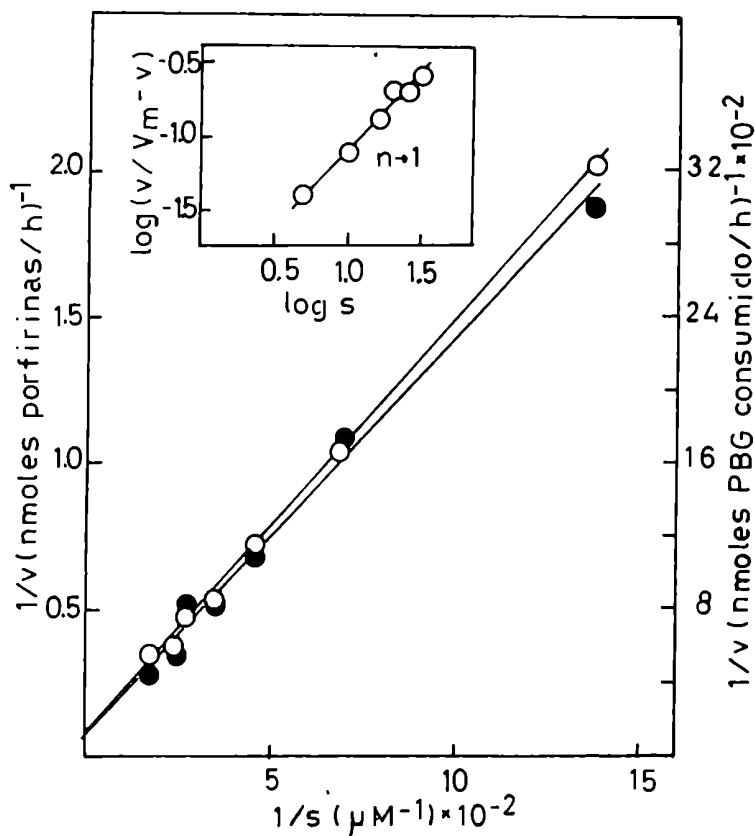


FIGURA II.7.: Gráfico de Lineweaver-Burk para la PBG-asa. Las condiciones experimentales son las detalladas en la leyenda de la Figura II.6. Las V_{max} empleadas en el inset son las determinadas a partir del gráfico de inversas.

Con la PBG-asa de *E. gracilis* se observó un exceso para el consumo de sustrato, de 4 veces respecto del teórico, calculado en base a las porfirinas formadas. Este valor de 4 fue constante hasta llegar a saturación, momento a partir del cual

R (formación de porfirinas teórica/formación de porfirinas real) aumentaba rápida y linealmente hasta alcanzar un valor de 10 para la máxima concentración de PBG ensayada (150 μM). Dado que para esta enzima se encontró una fase lag para la formación de porfirinas paralela a un consumo inicial muy elevado de PBG, seguidos de una formación lineal de producto y un consumo aproximadamente constante de sustrato; el exceso observado en este último se adjudicó en esa oportunidad a la formación de intermediarios polipirrólicos los cuales se encontrarían presentes a lo largo de toda la reacción (Rossetti y Batlle, 1977).

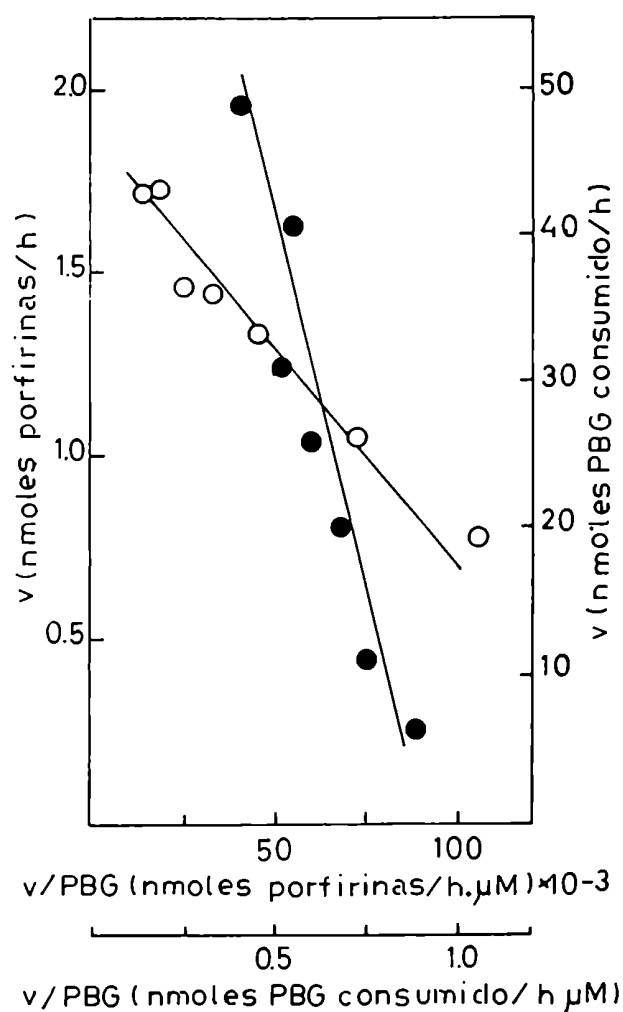


FIGURA II.8.: Gráfico de Eadie para la deaminasa. Las condiciones experimentales son las detalladas en la leyenda de la Figura II.4.

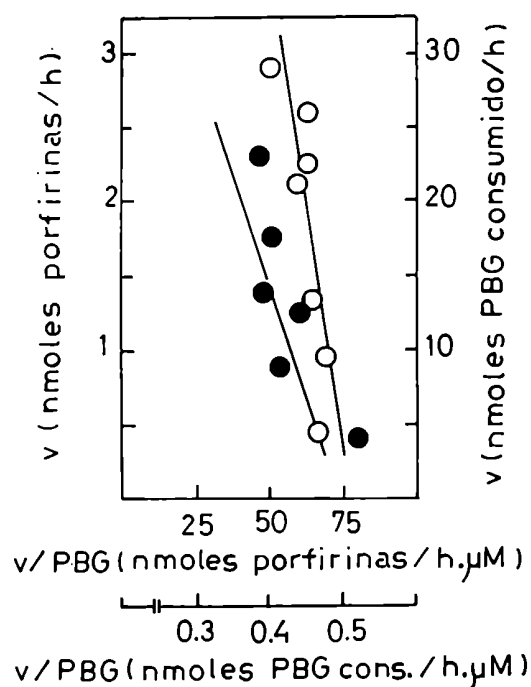


FIGURA II.9.: Representación de Eadie para PBG-asa. Las condiciones experimentales se detallan en la leyenda de la Figura II.6.

Para la PBG-asa de *Rp. palustris*, dicho exceso en el consumo de sustrato fue de 3 veces para la zona sigmoidea de la curva de formación de porfirinas, seguido de un consumo de 2 veces con respecto al valor teórico hasta llegar a la saturación y finalmente, éste aumentó en forma lineal hasta una concentración de PBG de $450 \mu M$ alcanzando R un valor de aproximadamente 7 (Juknat, 1983).

Para la deaminasa de la misma fuente, Kotler y col. (1987 b) encontraron un exceso de 5 veces para concentraciones bajas de sustrato (hasta $30 \mu M$) y luego un aumento lineal del mismo hasta $350 \mu M$, alcanzando R en este caso un valor muy superior al hallado para la PBG-asa ($12 < R < 50$).

En hígado de cerdo se observa una estequiometría llamativamente diferente para ambas enzimas (Figura II.10.).

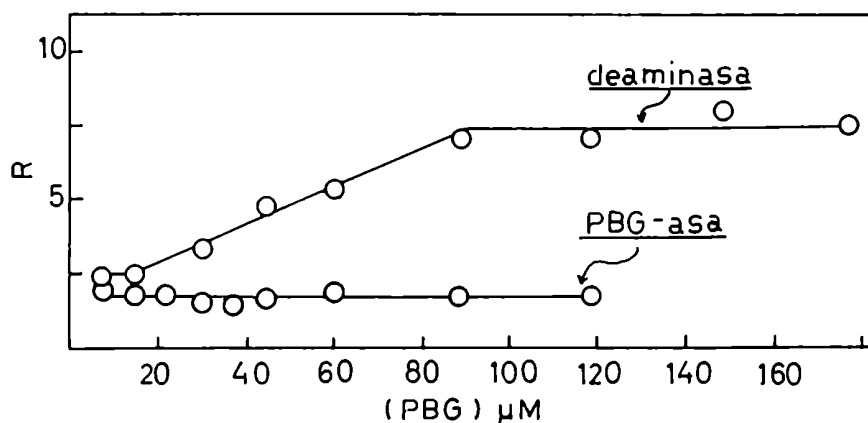


FIGURA II.10.: Estequiometría de la reacción. La relación R se calcula como nmoles de porfirinas teóricas sobre nmoles de porfirinas reales; a su vez las porfirinas teóricas son estimadas a partir de los nmoles de PBG consumidos durante la reacción y las reales son las porfirinas totales formadas durante la incubación.

Para la deaminasa, la relación R tiene un valor constante de aproximadamente 2,5 para las menores concentraciones de sustrato ensayadas, luego aumenta en forma lineal hasta alcanzar nuevamente un valor constante (7 - 8) para concentraciones de PBG saturantes.

Para la PBG-asa de la misma fuente, en cambio, se observa una relación constante, de aproximadamente 2, para todo el rango de concentraciones de sustrato estudiadas.

Vemos que, análogamente a lo encontrado para las enzimas de *Rp. palustris*, el valor de R es mayor para la deaminasa que para la PBG-asa, hecho que podría atribuirse a la acción inhibitoria que ejerce el HMB sobre la enzima que lo produce (Battersby y col., 1983).

Así, a bajas concentraciones de PBG, cuando el nivel de HMB libre en solución es probablemente muy bajo, la falta de estequiometría ($R = 2,5$) podría atribuirse a la formación de los intermediarios polipirrólicos, que aún no han alcanzado la

longitud adecuada para su liberación y ciclización final a Urogen I. Luego, a medida que aumenta la concentración de sustrato ($R = 2,5 - 7,5$) paralelamente aumentará la de HMB. Este intermediario podría unirse alternativamente a otro sitio, diferente del sitio activo que no conduciría a la formación de producto. Además, como consecuencia de la unión podrían tener lugar cambios conformacionales que condujeran a una inhibición en la síntesis de Urogen's. Estos resultados estarían de acuerdo con la hipótesis de Kotler (1988), quien propuso para la deaminasa de hígado vacuno, la existencia de un sitio regulatorio diferente del sitio activo, al cual se uniría el HMB.

A concentraciones de PBG mayores que $90 \mu M$, R alcanza un valor máximo y constante. Este efecto podría explicarse considerando que en esta zona no existe enzima disponible como para que el HMB siga ejerciendo su acción inhibitoria.

Aparentemente estos resultados estarían en desacuerdo con los hallados por Williams y col. (1981) para la deaminasa de *Euglena gracilis*. Sin embargo, estos autores estudiaron la estequiometría de la reacción empleando pequeñas cantidades de enzima y un gran exceso de sustrato ($320 \mu M$), lo cual evitaría la inhibición del HMB y justificaría la estequiometría observada.

Asimismo, en el caso de la PBG-asa, el HMB no quedaría libre en solución, sino que sería tomado inmediatamente por la isomerasa, enzima que lo convierte en Urogen III. Esta rápida remoción del producto, si bien explicaría la estequiometría constante no justificaría el alejamiento de la relación esperada (cercana a uno). Sin embargo, no nos debemos olvidar que durante la reacción catalizada por la PBG-asa, se forman intermediarios polipirrólicos que originan un consumo adicional de sustrato.

II.7. ESTUDIO CINETICO COMPARATIVO

En la Tabla II.2. se han reunido los parámetros cinéticos de la deaminasa y PBG-asa provenientes de la misma fuente; no se han incluido aquellos datos obtenidos en estudios efectuados solamente sobre la deaminasa. A fines comparativos se han agregado en último término los resultados obtenidos en el presente trabajo.

TABLA II.2.: Parámetros cinéticos de la PBG-asa y la deaminasa de distintas fuentes

ENZIMA	FUENTE	K_m (u.M)	GRAFICO DE MICHAELIS- MENTEN	GRAFICO DE INVERSAS	n DE HILL	REFERENCIA
DEAMINASA	Hígado bovino	5	hiperbólico	lineal	1	Sancovich y col. (1969 a, b)
	Eritrocitos de ave	9	hiperbólico	lineal		Llanbfas y Batlle (1971 b)
	Callos de soya	$K_1 = 32$ $K_2 = 190$			(PBG) $\nu = 2$ (PBG) $\nu = 1$	Llanbfas y Batlle (1971 a)
	Enzima			lineal	-	Williams y col. (1981)
	Ro.	21,99	hiperbólico	lineal		Fotler y col. (1987)
	Hígado porcino	10,00	hiperbólico	lineal		Funagalli, presente Tesis
	Hígado bovino	11 - 14	sigmoide	-	2	Sancovich y col. (1969 a, b)
	Eritrocitos de ave					Llanbfas y Batlle (1971 b)
	Callos de s	$K_1 = 4,5$ $K_2 = 500$			(PBG) $\nu = 1$ (PBG) $\nu = 1$	Llanbfas y Batlle (1971 a)
	Enzima	11,10	hiperbólico s/producto sigmoide s/PBG-asa	lineal coop. +	1 1,7	Rossetti (1978)
	Ro. de sustrato	50	sigmoide	coop. +	2	Juknat (1983)
	Hígado porcino	167	hiperbólico	lineal	1	Funagalli, presente Tesis

Analizando esta información se observa que las afinidades son superiores para la deaminasa. En cuanto al comportamiento cinético es importante destacar que el correspondiente a la PBG-asa varía ampliamente presentando cooperatividades positivas, negativas e incluso ausencia de efectos homotrópicos, según la fuente en estudio, mientras que la deaminasa presenta en general una cinética michaeliana, con la única excepción de la enzima de callos de soya.

Finalmente, señalaremos que la PBG-asa de hígado de cerdo presenta un K_m 10 unidades superior al de la de hígado bovino indicando que su afinidad por el sustrato es relativamente baja.

OTRAS PROPIEDADES

	Página
III.1. Efecto de protectores de grupos tioles y disulfuro	159
III.2. Efecto de inhibidores de grupos tioles y disulfuro	160
III.3. Efecto de iones amonio sobre la actividad enzimática	167
III.4. Acerca de la existencia de un factor regulador	167

III. OTRAS PROPIEDADES

III.1. EFEECTO DE PROTECTORES DE GRUPOS TIOLES Y DISULFURO

Como ya se ha comentado, se sabe que tanto la deaminasa como la PBG-asa son enzimas sulfhidrúlicas, si bien algunos autores han encontrado que la cisteína y otros reactivos protectores a concentraciones 0,1 mM y 1 mM no modifican la actividad de las mismas (Sancovich y col., 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 b; Kotler y col., 1987 a). Resultó entonces de interés investigar el efecto de diferentes reactivos sobre los grupos tioles y disulfuro de ambas enzimas.

En la Tabla III.1. se muestran los resultados obtenidos al trabajar con deaminasa, bajo condiciones de incubación diferentes, o sea, en anaerobiosis y aerobiosis con y sin preincubación. La preincubación se realizó en anaerobiosis, a 37 °C y durante 20 minutos en ausencia de PBG, el cual fue agregado al finalizar la misma. Del análisis de los datos surge que ni la atmósfera, ni la preincubación produjeron efecto alguno. Vemos además, que la cisteína en las concentraciones estudiadas tampoco tiene acción y que el resto de los reactivos sólo inhiben a concentraciones mayores a 1 mM. También se observa un mayor porcentaje de inhibición sobre la formación de producto que sobre el consumo de PBG.

Análogamente, se estudió el efecto de estos reactivos sobre la PBG-asa de hígado de cerdo (Tabla III.2.), pero solamente bajo condiciones anaeróbicas, debido a que los resultados experimentales previos indicaron que el oxígeno inhibe la isomerasa, razón por la cual en atmósfera aeróbica mediríamos la actividad de la deaminasa y no la del complejo.

La tabla muestra resultados similares a los obtenidos con deaminasa, a pesar de haberse empleado condiciones de incubación diferentes. Es decir, la preincubación no produjo modificación alguna con esta familia de compuestos. También se observa que la cisteína, en un rango de 0,1 a 50 mM así como el GSH, ditiotreitól (DTE) y tioglicolato a concentraciones menores o iguales a 1 mM no tuvieron efecto. Estos últimos reactivos a concentraciones superiores mostraron alguna acción, que al igual que antes fue sensiblemente mayor sobre la formación de producto

que sobre el consumo de PBG; ésto podría deberse a la reacción con algún grupo sulfhidrilo esencial, lo cual es factible a concentraciones elevadas de estos compuestos.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, podemos asegurar que si bien la deaminasa y la PBG-asa son enzimas sulfhidrúlicas, no requerirían la presencia de reactivos protectores de grupos tioles para manifestar su actividad.

III.2. EFEECTO DE INHIBIDORES DE GRUPOS TIOLES Y DISULFURO

Es otro hecho conocido que los reactivos inhibidores de grupos tiólicos afectan en diferente grado la formación de producto y el consumo de PBG, inhibiendo, en general, más fuertemente la producción de porfirinas, lo cual podría explicarse pensando que el/los grupos tiólicos están relacionados con la etapa de ciclización de la porfirina. También es posible que existan grupos tiólicos esenciales para la actividad, ya que algunos agentes que clivan uniones disulfuro, inhiben parcialmente la reacción (Llambías y Batlle, 1971 a; Sancovich y col., 1976) y además, el cianuro no inhibe totalmente la formación de porfirinas pero forma un 80 % de Urogen I en lugar de III (Lockwood y Benson, 1960; Llambías y Batlle, 1971 a), como si este compuesto interfiriera o compitiera con el sustrato de la isomerasa.

Con el objeto de obtener mayor información acerca de la presencia de grupos sulfhidrilos y disulfuros esenciales en la estructura de la PBG-asa y la deaminasa, los cuales podrían jugar un rol importante en la reacción, se realizó un estudio comparativo entre estas dos enzimas empleando una gran variedad de compuestos, los cuales fueron clasificados en cinco grupos, de acuerdo a su conocida acción específica. El grupo I está constituido por agentes alquilantes, formadores de uniones de tipo mercaptida con los restos sulfhidrúlicos. El grupo II abarca oxidantes de grupos tioles. En el grupo III, se ven los resultados obtenidos empleando diferentes concentraciones de arsenito, el cual a valores de 1 mM o menores es capaz de reaccionar con restos tioles vecinos (Batlle y col., 1965), en tanto que a mayores de 10 mM, lo hace sobre monotioles. El grupo IV abarca una serie de compuestos que manifiestan su acción sobre uniones disulfuro. Finalmente se ha incluido el grupo V, con metales pesados cuya

afinidad por los restos sulfhidrilos es muy alta dado que los productos de solubilidad de sus respectivos sulfuros son muy bajos.

Como se detalló para grupos, la actividad enzimática se midió en aerobiosis y anaerobiosis, con y sin preincubación y agregando los diferentes reactivos antes que el PBG, en todos los casos.

En la Tabla III.3. se presentan los resultados correspondientes a la deaminasa de hígado porcino. Es necesario destacar que debido a que no hubo diferencias notables empleando distintas condiciones de incubación, se ilustran solamente los datos obtenidos en aerobiosis y sin preincubación. En los casos en los cuales se estudió la reversión de la inhibición se procedió como se describe en la Tabla.

En la Tabla III.4. se muestra la acción de los inhibidores sobre la PBG-asa, incluyéndose solamente los datos correspondientes a la atmósfera anaeróbica y sin preincubación, ya que este último proceso no afecta mayormente los resultados. Sin embargo, en los casos de intento de reversión, al igual que antes fue necesario presentar los valores con preincubación.

Del análisis de esta última tabla (Tabla III.4.) surge que los compuestos del grupo I, excepto la iodoacetamida, inhiben más acentuadamente la formación de Urogen III que el consumo de PBG. Cisteína y BAL (British Anti-Lewisite o dimercapto propa nol) son capaces de revertir estos efectos. Dentro del grupo II, todos los agentes oxidantes afectan sensiblemente la reacción, en tanto que en el grupo III se visualiza la acción del arsenito sobre los restos monotioles. El efecto del grupo siguiente demuestra que tampoco habría puentes disulfuro, esenciales para la enzima. Finalmente, es clara la acción de los metales pesados sobre los restos sulfhidrilos, revertida por tratamiento simultáneo con cisteína.

Como era de esperar, para la deaminasa (Tabla III.3.), tanto el p-cloromercuribenzoato (PCMB) como la N-etilmaleimida (NEMI), experiencias 1 y 4, inhibieron significativamente a una concentración de 1 mM. Como ya observamos anteriormente, la acción de esta familia de reactivos es más acentuada sobre la formación de producto que sobre el consumo de PBG.

TABLA III.1.: Efecto de reactivos protectores de grupos tioles y disulfuro sobre la deaminasa

PREINCUBACION	ADICION		AEROBIOSIS		ANAEROBIOSIS	
	Reactivo	Conc. final (mM)	Consumo PBG (%)	Formación Urogen I (%)	Consumo PBG (%)	Formación Urogen I (%)
+ -	GSII	50	90	38	80	39
+ -			93	40	83	41
+ -		10	100	85	103	84
+ -			100	88	98	84
+ -		1	100	95	104	96
+ -			100	98	100	99
+ -		10 ⁻¹	100	100	104	102
+ -			100	100	105	100
+ -	Cisteína	50	100	100	105	105
+ -			105	100	100	108
+ -		10	110	104	108	105
+ -			110	100	106	100
+ -		1	105	100	110	100
+ -			110	103	110	98
+ -		10 ⁻¹	100	100	100	97
+ -			100	98	100	98
+ -	DTE	10	98	75	97	80
+ -			95	78	95	75
+ -		1	100	93	104	95
+ -			100	98	100	96
+ -		10 ⁻¹	98	100	100	100
+ -			100	100	100	100
+ -	Tioglicolato	10	90	70	92	68
+ -			85	68	90	70
+ -		1	100	97	100	95
+ -			100	95	101	100
+ -		10 ⁻¹	100	98	100	100
+ -			105	100	100	98

Se empleó deaminasa purificada 150 veces (0,5 mg proteína). Las actividades en presencia de reactivos se expresan sobre la base de la actividad del control tomada como 100 %. En todos los casos de incubación directa el PBG se añadió después de la adición del compuesto en estudio. El sistema de incubación y las condiciones empleadas fueron las usuales. La preincubación se realizó a 37 °C durante 20 min, colocándose el reactivo en el medio de incubación y el PBG fue adicionado posteriormente, ya sea directamente cuando la incubación fue aeróbica o por inversión del tubo de Thunberg cuando fue anaeróbica. El resto de la metodología se describe en Materiales y Métodos, salvo para la determinación de PBG remanente, en la cual se hizo necesario el agregado de unas gotas de sulfato de cobre previo a la adición de reactivo de Ehrlich, para evitar el enmascaramiento.

TABLA III.2.: Efecto de reactivos protectores de grupos tioles y disulfuro sobre la PBG-asa

PREINCU BACION	ADICION		CONSUMO PBG (%)	FORMACION UROGEN III (%)		
	Reactivo	Conc. final (mM)				
+ -	GSH	50	90 95	60 55		
+ -		10	100 98	68 70		
+ -		1	100 100	95 95		
+ -		10^{-1}	100 100	100 100		
+ -		Cisteína	50	100 104	104 100	
+ -			10	110 105	103 100	
+ -			1	100 100	99 100	
+ -			10^{-1}	100 100	99 100	
+ -			DTE	10	95 90	76 78
+ -				1	100 100	93 95
+ -		10^{-1}		100 100	100 100	
+ -		Tioglicolato		10	93 95	67 65
+ -	1		100 100	97 95		
+ -	10^{-1}		100 100	100 100		

Se empleó PBG-asa purificada 35 veces (0,3 mg proteína). El sistema y las condiciones de incubación empleadas fueron las usuales, Salvo en los casos en que se hizo la preincubación. Esta se realizó a 37 °C durante 20 minutos, colocándose el reactivo en el medio de incubación y el PBG en la ampolla lateral del tubo de Thunberg; luego de la preincubación se agregó el sustrato por inversión. Otros detalles experimentales se indican en la leyenda de la Tabla III.1.

TABLA III.3.: Efecto de inhibidores de grupos tioles y disulfuro sobre la deaminasa

GRUPO	EXPERIENCIA N°	1° REACTIVO		2° REACTIVO		CONSUMO PBG (%)	FORMACION UROGEN I (%)
		Adición	Conc. final (mM)	Adición	Conc. final (mM)		
I	1		1	-	-	40	2,5
	2	PCMB	1	BAL	5	100	98
	3		1	Cisteína	5	100	104
	4		5	-	-	70	20
	5	NEMI	1	BAL	5	100	96
	6		1	Cisteína	5	105	92
II	7	DTNB	1		-	70	35
	8		5		-	50	8
	9	Cistina	1		-	80	40
	10		5		-	70	20
	11	Glutación oxidado	1		-	75	30
	12		5		-	50	4
	13	I-benzoato	1	-	-	70	30
14	5		-	-	40	50	
III	15	Arsenito	1	-	-	105	104
	16		10	-	-	88	86
	17		100	-	-	90	80
	18		10	BAL	10	92	80
	19		1	BAL	1	100	96
IV	20	Tiourea	1		-	110	110
	21		10		-	100	100
	22	NaCN	1		-	110	110
	23		10		-	115	112
	24	Na ₂ SO ₃	1	-	-	100	88
	25		10	-	-	100	85
V	26	Plomo	1			50	4
	27		10			30	2
	28	Mercurio	1			47	6
	29		10		-	28	4
	30	Cadmio	1			48	6
	31		10			30	2
	32	Zinc	1		-	48	9
	33		10		-	27	5
	34	Calcio	1	-	-	100	90
	35		10	-	-	90	85

Se empleó deaminasa purificada 150 veces. El sistema de incubación fue el usual, incubándose en aerobiosis y sin preincubación. Sin embargo, en los casos en que se estudió la reversión de la inhibición por BAL y cisteína, estos reactivos fueron agregados 20 minutos después de haber preincubado con el inhibidor y el sustrato. El resto de la metodología fue la usual.

TABLE III.4.: Efecto de inhibidores de grupos tioles y disulfuro sobre la PBG-asa

GRUPO	EXPERIENCIA N°	1° REACTIVO		2° REACTIVO		CONSUMO PBG (%)	FORMACION UROGEN III (%)
		Adición	Conc. final (mM)	Adición	Conc. final (mM)		
I	1		1		-	30	2,7
	2	PCMB	5	-	-	30	2,8
	3		1	BAL.	5	100	100
	4		1	Cisteína	5	100	100
	5	NEMI	1		-	70	19
	6	NEMI	5	-	-	71	22
	7	NEMI	5	BAL.	5	100	100
	8		5	Cisteína	5	100	100
	9	1-acetamida	1	-	-	100	100
	10		5	-	-	96	94
II	11	DTNB	1	-	-	75	64
	12		5	-	-	60	34
	13	Cistina	1		-	85	50
	14		5		-	75	30
	15	Glutati6n oxidado	1		-	70	20
	16		5		-	50	5
	17	1-benzoato	1	-	-	70	25
	18		5	-	-	40	5
III	19		1	-	-	100	102
	20		10	-	-	90	85
	21	Arsenito	100	-	-	80	80
	22		10	BAL.	10	100	75
	23		1	BAL.	1	100	90
	24		1		-	100	96
	25	BAL.	10	-	-	100	90
IV	26	Tiourea	1		-	110	112
	27		10		-	100	79
	28	NaCN	1		-	120	116
	29		10		-	120	122
	30	Na ₂ SO ₃	1	-	-	100	97
	31		10	-	-	100	90
V	32	Plomo	1	-	-	52	4
	33		10	-	-	30	15
	34	Mercurio	1	-	-	50	5
	35		10	-	-	24	10
	36	Cadmio	1		-	48	6
	37		10		-	28	12
	38	Zinc	1		-	45	7
	39		10		-	38	15
	40	Calcio	1	-	-	100	90
	41		10	-	-	95	90
	42	Plomo	1	Cisteína	5	98	95
	43	Mercurio	1	Cisteína	5	95	90

Se empleó PBG-asa purificada 35 veces. El sistema de incubación fue el usual, incubándose en anaerobiosis sin preincubación. Sin embargo, en los casos en que se estudió la reversión de la inhibición por BAL o cisteína, estos reactivos fueron agregados 20 minutos después de haber preincubado con el inhibidor y el sustrato. La metodología utilizada fue la descrita en Materiales y Métodos.

Cuando se preincubó la enzima con PCMB o NEMI por 20 minutos (experiencias 2, 3, 5 y 6) y luego se agregó al medio BAL o cisteína, éstos revirtieron el efecto del inhibidor totalmente a una concentración 5 mM; cabe mencionar que la reversión también se observó empleando cualesquiera de los tioles a 10 mM, agregándolos 1 minuto antes o 1 minuto después del inhibidor.

Vemos además, que los reactivos del grupo II ejercen un efecto inhibitorio marcado.

El arsenito, por su parte, sólo tiene algún efecto sobre los monotioles de restos proteicos. De acuerdo a los resultados obtenidos con los compuestos del grupo IV, parecería que los grupos disulfuro no están involucrados en el sitio activo de la deaminasa, ni son esenciales para su actividad.

Como era de esperar, casi todos los metales pesados, ya a concentraciones de 1 mM inhibieron prácticamente en forma total la formación de porfirinas y alrededor de un 50 % el consumo de PBG, a excepción del calcio.

En base a los datos obtenidos podemos asegurar que en la deaminasa de hígado de cerdo, al igual que en la enzima de otras fuentes (Frydman y Frydman, 1970; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Jordan y Shemin, 1973; Sancovich y col., 1976; Russell y Rockwell, 1980) y similarmente a la PBG-asa porcina, existirían grupos tioles y disulfuros esenciales para la ciclización del urogen, los cuales sin embargo no requieren la presencia de reactivos protectores para manifestar la máxima actividad enzimática, sugiriendo que deben encontrarse en un entorno tal, constituido por restos de otros aminoácidos que los protegen de la oxidación.

De lo anteriormente expuesto podemos decir que la PBG-asa porcina es una enzima en la cual existen grupos sulfhidrilos y ditiolos vecinales involucrados en el sitio activo. Es también evidente que en presencia de algunos de estos compuestos la síntesis de Urogen III se vió más afectada que el consumo de PBG, de acuerdo entonces con la hipótesis de la existencia de dos etapas y/o dos sitios activos en la reacción de formación de porfirinas a partir de PBG; una polimerización y una ciclización final, siendo precisamente esta última la más sensible a determinados inhibidores. Es posible entonces que los grupos tioles o ditiolos estén involucrados precisamente en la etapa de ciclización del tetrapirrilmetano.

III.3. EFEECTO DE IONES AMONIO SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

El efecto de los iones amonio sobre la deaminasa fue descrito primeramente por Bogorad (1962, 1963), quien encontró que este catión inhibía el consumo de PBG en menor grado que la formación de producto. Unos años después, Sancovich y col. (1969 a, b) encontraron, trabajando con deaminasa y PBG-asa, de hígado vacuno, que el amonio inhibe ambas enzimas, fenómeno que también fue descrito para estas enzimas en otras fuentes (Llambías y Batlle, 1971 a, b; Frydman y Feinstein, 1974; Juknat, 1983; Kotler y col., 1987 b). Nuestro grupo de trabajo, basándose en la acción de los iones amonio sobre la deaminasa y la PBG-asa, propuso que estos cationes podrían inhibir la isomerasa por unión al mismo sitio del PBG sobre la enzima o a un sitio diferente por ejemplo el sitio del polipirrol o quizás podrían causar una disociación del complejo deaminasa-isomerasa (Sancovich y col., 1969 a, b; Stella y col., 1971).

En la Tabla III.5. se muestra el efecto del amonio sobre las enzimas de hígado porcino. Se observa que a concentraciones en las que se inhibe la formación de Urogen I (≥ 10 mM) o de Urogen III (≥ 1 mM), no tiene efecto o bien éste es mucho menor, sobre el consumo de PBG.

Ya se ha comentado (Radmer y Bogorad, 1962; Pluscec y Bogorad, 1970; Davies y Neuberger, 1973) que por acción del amonio sobre la deaminasa de *Rp. spheroides* y hojas de espinaca, se inhibe en mayor grado la formación de producto, induciéndose la acumulación de intermediarios polipirrólicos de estructura lineal ordenada, es decir, di y tetrapirril-metanos de tipo PAPA y PAPAPAPA. En este caso, aparentemente, estaría ocurriendo lo mismo por cuanto por cromatografía en capa delgada de sobrenadantes provenientes de las experiencias con deaminasa y amonio desde 10 hasta 200 mM, se han detectado manchas que corresponderían a un intermediario, probablemente del tipo tetrapirrilmetano.

III.4. ACERCA DE LA EXISTENCIA DE UN FACTOR REGULADOR

Sancovich y col. (1969 a) describieron la presencia de un factor regulador de la actividad de PBG-asa de hígado bovino, el cual al ser separado por ultrafiltración de la fracción

sobrenadante provocaba la pérdida de un 50 a 100 % de la actividad enzimática. La mezcla posterior del sobrenadante ultrafiltrado y el residuo, restauraba y aún incrementaba la actividad del sobrenadante original. Estos hallazgos estimularon la búsqueda de un factor regulador análogo en hígado de cerdo, el cual debería ser de bajo PM, ya que difunde en el proceso de ultrafiltrado.

TABLA III.5.: Efecto de iones amonio sobre la actividad enzimática

ADICION	CONC. FINAL (mM)	DEAMINASA		PBG-asa	
		Consumo PBG (%)	Formación URO I (%)	Consumo PBG (%)	Formación URO III (%)
Control	-	100	100	100	100
	10^{-2}	100	100	100	100
	10^{-1}	100	100	100	100
	1	100	100	100	94
Amonio	10	100	75	96	67
	50	96	68	88	53
	100	91	60	81	40
	200	86	50	57	18

Se emplearon enzimas purificadas 150 y 35 veces como fuente de deaminasa y PBG-asa respectivamente. Como sal inhibitoria se usó sulfato de amonio pues se sabe que el anión no interfiere. El sistema de incubación fue el usual salvo por el agregado de la sal en concentraciones variables según se indica. La metodología utilizada fue la descrita en Materiales y Métodos.

En nuestro caso dado los resultados obtenidos por Juknat de Geralnik y col. (1981) en *Euglena gracilis*, se intentó separar esta pequeña molécula por cromatografía por tamices moleculares. De esta manera se sembró el sobrenadante proveniente de la centrifugación a 10.000 x g del homogenato, en una columna de Sephadex G-25 grueso, recogiendo la fracción proteica, que deno-

minamos "proteínas del sobrenadante" y recolectando los eluidos subsiguientes hasta completar el volumen de cama de la columna, fracción que identificamos como "Factor". Luego se hicieron las mezclas correspondientes, empleando en todos los casos la relación de volúmenes 1:1 (Tabla III.6.).

TABLA III.6.: Búsqueda de un factor regulador en hígado porcino

SISTEMA	ACTIVIDAD ESPECIFICA	
	nmoles porf/mg	nmoles PBG cons/mg
Sobrenadante	0,34	13,4
Proteínas del sobrenadante	0,36	18,6
Factor	0,00	
Sobrenadante + factor	0,35	11,3
Proteínas del sobrenadante más factor	0,39	20,1
Sobrenadante + proteínas del sobrenadante	0,36	15,3

Como preparaciones enzimáticas se emplearon las siguientes fracciones: Sobrenadante (9,11 mg proteína/ml); Proteínas del sobrenadante (4,64 mg proteína/ml) y Factor (0,08 mg proteína/ml), obtenidas según se detalla en el texto.

El sistema de incubación contenía 1 ml de fracción y 1 ml de factor (relación 1:1), 60 µg de PBG y se llevó a 3 ml de volumen final con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4. En los casos de los controles se colocó 1 ml de fracción, la misma cantidad de sustrato y se llevó a idéntico volumen final con el mismo buffer. Las condiciones de incubación y el resto de la metodología fue la usual.

Analizando los resultados vemos que no existe ninguna modificación de la actividad por el agregado de la fracción conteniendo el supuesto factor. Sin embargo, para descartar la posibilidad de que la relación utilizada en la mezcla no hubiese sido la más conveniente, se llevó a cabo una experiencia en la cual

se emplearon diferentes relaciones, que cubrieron un amplio rango (1:0,25; 1:0,5; 1:1; 1:2 y 1:5). Los resultados mostraron nuevamente la ausencia en hígado porcino de alguna molécula de bajo peso molecular, que modificara la actividad del complejo enzimático.

III.5. EFFECTO DEL FACTOR REGULADOR DE *Euglena gracilis* SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS DE HIGADO DE CERDO

Juknat de Geralnik y col. (1981, 1988 b, c) llevaron a cabo estudios que condujeron a la detección, aislamiento e identificación de un factor regulador de la actividad de la PBG-asa y deaminasa de *Euglena gracilis*. Dicho factor podía separarse por calentamiento o cromatografía sobre Sephadex G-25 de las fracciones crudas. El efecto activante de este compuesto de bajo peso molecular fue comparable con aquel producido por el ácido fólico a una concentración 10^{-7} M.

De acuerdo a estos hallazgos, se pensó en la posibilidad de que el factor de *Euglena gracilis* pudiese tener algún efecto sobre la PBG-asa y/o deaminasa de hígado de cerdo.

En la Tabla III.7. se muestran los resultados correspondientes a esta experiencia.

Las fracciones provenientes de *Euglena gracilis* se prepararon de la siguiente manera: el tejido cosechado se resuspendió en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 en la relación 1 g tejido fresco:2 ml de buffer, luego se sonicó durante 30 segundos obteniéndose así la fracción homogenato, la cual se centrifugó 30 minutos a 20.000 x g. De esta centrifugación resultó un pellet, que se descartó, y un sobrenadante. Posteriormente, se sembró dicha fracción en una columna de Sephadex G-25; recogiendo, por un lado la fracción proteica (Proteínas del sobrenadante de *Euglena gracilis*) y por el otro, los eluidos posteriores hasta completar el volumen de cama (Factor de *Euglena gracilis*) (Juknat de Geralnik y col., 1981). De manera análoga, a partir del Sobrenadante proveniente de la centrifugación a 10.000 x g del homogenato de hígado porcino, se obtuvo la fracción Proteínas del sobrenadante hepáticas. Por otra parte, como fuente de deaminasa se emplearon, en ambos casos, los sobrenadantes de calentamiento (Rossetti, 1978 e ítem I.1.1.).

TABLA III.7.: Efecto del factor regulador de *Euglena gracilis* sobre la actividad de las enzimas de hígado porcino

SISTEMA	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmoles porf/mg)
Sobrenadante de hígado porcino	0,34
Proteínas del sobrenadante de hígado porcino	0,36
Deaminasa de hígado porcino	8,16
Sobrenadante de <i>E. gracilis</i>	0,46
Proteínas del sobrenadante de <i>E. gracilis</i>	0,64
Factor de <i>E. gracilis</i>	0,00
Deaminasa de <i>E. gracilis</i>	1,38
Proteínas sobrenadante de <i>E. gracilis</i> + factor de <i>E. gracilis</i>	0,78
Deaminasa de <i>E. gracilis</i> + factor de <i>E. gracilis</i>	2,48
Sobrenadante hígado porcino + factor de <i>E. gracilis</i>	0,29
Proteínas sobrenadante hígado porcino + factor <i>E. gracilis</i>	0,30
Deaminasa de hígado porcino + factor de <i>E. gracilis</i>	7,90

Como fuente enzimática se emplearon diferentes fracciones, las cuales fueron obtenidas según se detalla en el texto. El sistema de incubación consistió de: 1 ml de fracción enzimática, 1 ml de factor (relación 1:1), 60 µg de PBG y se completó con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4 hasta alcanzar un volumen final de 3 ml. En los casos de los controles se colocó 1 ml de fracción, la misma cantidad de sustrato y se llevó a 3 ml con el mismo buffer. Se incubó en anaerobiosis por 2 horas; el resto de la metodología empleada fue la usual.

En experiencias similares realizadas en nuestro laboratorio con PBG-asa de hígado vacuno, se comprobó que el factor de *Euglena gracilis* parecería no actuar como tal en buffer Tris-HCl,

de manera que fue necesario cambiar el buffer de incubación, empleando en este caso buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4.

Analizando los resultados, vemos que el factor de *Euglena gracilis* activa las enzimas de esa fuente como ya había sido demostrado (Juknat de Geralnik y col., 1981; Juknat de Geralnik, 1983), pero no afecta la actividad ni de la PBG-asa ni de la deaminasa de hígado de cerdo, pues los datos correspondientes a sobrenadante, proteínas de sobrenadante y deaminasa con y sin factor son comparables.

Finalmente, estos resultados estarían de acuerdo con los de Juknat (1983) quien tampoco encontró efecto estimulante del factor de *E. gracilis* sobre las enzimas de hígado de vaca y *Rp. palustris*. Por lo tanto podríamos concluir que es posible que en estos casos no exista sitio receptor para dicho compuesto o bien que la actividad de las mismas sea relativamente elevada como para que este factor pueda expresarse.

P A R T E I I

DEAMINASA Y PBG-asa DE ERITROCITOS HUMANOS

CAPITULO I

AISLAMIENTO Y PURIFICACION. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

	Página
I.1. Purificación de la deaminasa	173
I.1.1. Ensayos preliminares	173
I.1.2. Purificación de la deaminasa	174
I.2. Purificación de la PBG-asa	180
I.2.1. Ensayos preliminares	180
I.2.2. Purificación de la PBG-asa	183
I.3. Determinación de los pesos moleculares	185

PARTE II: DEAMINASA Y PBG-asa DE ERITROCITOS HUMANOS

I. AISLAMIENTO Y PURIFICACION. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

I.1. PURIFICACION DE LA DEAMINASA

I.1.1. Ensayos preliminares

El primer paso en el proceso de purificación de las enzimas de glóbulos rojos es la eliminación de la hemoglobina. Gran parte de esta proteína se elimina mediante un tratamiento con solventes orgánicos (Scott, 1976), el cual fue empleado, con algunas modificaciones, por Bustos y col. (1980) para purificar ALA-D de eritrocitos humanos. Estos autores utilizando el método de Scott modificado purificaron la enzima alrededor de 24 veces, separando el 96 - 97 % de la hemoglobina. Por estos motivos y dada la sencillez operativa se utilizó este procedimiento como primera etapa de purificación.

Posteriormente, se intentó realizar sobre la fracción proveniente de la diálisis (ver "Materiales y Métodos") un tratamiento con ácido acético glacial, el cual, como ya lo hemos indicado, había sido sumamente efectivo para la purificación de la deaminasa de otros tejidos. Es así que el sobrenadante de diálisis se trató con este ácido, siguiendo un procedimiento análogo al descrito en este trabajo durante la purificación de las enzimas de hígado porcino (Parte I).

Los resultados mostraron que el tratamiento ácido produce una pérdida importante de unidades (aproximadamente 70 %) que se traduce en una disminución significativa de la actividad enzimática, sin modificación de la concentración proteica. Esto nos indica que, evidentemente, esta etapa estaría inactivando de alguna manera la enzima, y en consecuencia, no puede ser utilizada en el proceso de purificación.

Como ya se mencionó anteriormente el calentamiento no sólo inactiva la isomerasa sino que también suele producir un incremento en la actividad de la deaminasa. Además, en la mayoría de los casos, la enzima puede incubarse a 65 °C por 15 a 30 minutos sin pérdida de actividad, aunque temperaturas cercanas a

ésta suelen causar una rápida inactivación. Por otra parte, se observó que la enzima es más susceptible al calentamiento a altas temperaturas cuando se encuentra en bajas concentraciones y cuanto mayor es su estado de purificación.

En la Tabla I.1. se muestran los resultados del calentamiento entre 60 °C y 75 °C a diferentes tiempos de una preparación de deaminasa de eritrocitos parcialmente purificada. Se observa que entre 60 °C y 70 °C y a todos los intervalos estudiados, no hay pérdida de actividad enzimática; la concentración proteica disminuye y paralelamente se incrementa la actividad específica. El calentamiento a 65 °C por 15 y 20 minutos y a 70 °C durante 5 y 10 minutos aumenta significativamente la formación de porfirinas totales y produce prácticamente 100 % del isómero I. Hallazgos similares se han descrito para la deaminasa de otras fuentes (Lockwood y Benson, 1960; Cornford, 1964; Sancovich y col., 1969 a, b; 1976; Frydman y Frydman, 1970; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Jordan y Shemin, 1973; Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti y col., 1980; Williams y col., 1981; Kotler y col., 1987 a). Cuando preparaciones conteniendo PBG-asa se someten a calentamientos a temperaturas y tiempos variables, se observa claramente que altas temperaturas inactivan y destruyen la isomerasa ya que el contenido proteico disminuye, la actividad aumenta y el isómero III cambia a tipo I. Sin embargo, en el presente estudio, la isomerasa se inactivó anteriormente, durante el tratamiento con solventes orgánicos, pues la fracción utilizada como control produce ya un 95 % del isómero I. No obstante, es probable que la cosintetasa aunque inactiva permanezca aún asociada a la deaminasa y se separe totalmente recién después del calentamiento, originando así una preparación más activa. Al respecto, nuestro grupo de trabajo ha propuesto que la isomerasa actúa regulando la actividad de la deaminasa en el complejo PBG-asa (Batlle y Rossetti, 1977).

Finalmente señalaremos, que la deaminasa de eritrocitos se inactiva rápidamente por calentamiento a 75 °C, con una pérdida total de actividad luego de los 15 minutos.

1.1.2. Purificación de la deaminasa

Luego de los ensayos preliminares, la secuencia de purificación que finalmente se adoptó fue la siguiente (Tabla I.2.);

salvo que se indique lo contrario todas las operaciones se llevaron a cabo a 4 °C.

TABLA I.1.: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

CALENTAMIENTO		PORFIRINAS		PROTEINAS (mg/ml)	PORFIRINAS FORMADAS (%)	
Temp. (°C)	Tiempo (min)	nmoles	nmoles/mg		URO I	URO III
60	5	1,72	0,92	9,35	95	5
	10	1,55	1,29	6,00	95	5
	15	1,32	1,36	4,85	96	4
	20	1,47	1,86	3,95	96	4
65	5	0,99	1,34	3,70	96	4
	10	1,06	1,56	3,40	96	4
	15	5,12	2,61	9,80	98	2
	20	5,64	3,22	8,75	98	2
70	5	5,23	3,06	8,55	98	2
	10	4,24	3,29	6,45	100	-
	15	3,87	3,58	5,40	100	-
	20	3,50	3,31	5,30	100	-
75	5	1,36	1,56	4,35	100	-
	10	0,19	0,29	3,20	100	-
	15	0,00	0,00	2,55	-	-
	20	0,00	0,00	2,25	-	-
Control		3,35	0,87	19,25	95	5

La fracción 30 - 80 % de saturación con sulfato de amonio se desaló por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25 grueso (control) y luego se calentó a diferentes temperaturas durante períodos variables, según se indica. Luego del calentamiento, la mezcla se centrifugó a 10.000 x g por 20 minutos y se descartó el precipitado. El resto de la metodología utilizada fue la usual.

Etapa 1: Tratamiento con solventes orgánicos: la hemoglobina se eliminó en un 96 - 97 % siguiendo el método de Scott (1976) modificado por Bustos y col. (1980), obteniéndose la fracción identificada como sobrenadante de diálisis.

Etapa 2: Fraccionamiento salino: con el objeto de concentrar la preparación enzimática proveniente de la etapa anterior, se realizó un fraccionamiento con sulfato de amonio, reuniendo las proteínas precipitadas entre 30 - 80 % de saturación con esta sal. El precipitado se centrifugó a 15.000 x g durante 10 minutos, descartándose el sobrenadante. La fracción así obtenida es estable al estacionamiento a -20 °C durante 15 días.

Etapa 3: Calentamiento: la fracción 30 - 80 % de saturación con sulfato de amonio se resuspendió en un volumen mínimo de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 y se desaló por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25 grueso. Los eluidos proteicos se calentaron a 70 °C durante 15 minutos, con agitación constante. Al finalizar el calentamiento, se enfrió en baño de hielo inmediatamente y se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos. Como resultado de la centrifugación se obtuvo un precipitado que se descartó y una fracción sobrenadante, conteniendo la enzima.

Etapa 4: Cromatografía sobre Sephadex G-100: la solución proteica proveniente de la etapa anterior se concentró 0 - 80 % con sulfato de amonio, se suspendió en un volumen mínimo de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 y se aplicó sobre una columna de Sephadex G-100. La Figura I.1. muestra el diagrama de elución; en ella se observa la presencia de un único pico de actividad, al cual correspondió una purificación de 1,5 veces.

Etapa 5: DEAE-celulosa: finalmente, la proteína se concentró por ultrafiltración en AMICON con filtro PM-10 y se sembró sobre una columna de DEAE-celulosa.

Anderson y Desnick (1980) habían encontrado que una preparación de deaminasa de eritrocitos humanos eluida de una columna de DEAE-celulosa mediante un gradiente lineal de cloruro de sodio 0 - 0,12 M se resolvía en 5 bandas (A, B, C, D y E). Los autores propusieron que estas bandas corresponderían a diferentes formas enzimáticas, las cuales podrían ser la enzima nativa (A) y los intermediarios enzima-sustrato en las etapas de condensación de 4 moléculas de PBG a Urogen.

No obstante, en 1984 Williams trabajando con HMB sintetasa de bazo de rata, encontró un comportamiento diferente según se aplicase o no el calentamiento sobre preparaciones enzimáticas crudas. Este autor halló 5 bandas con actividad de deaminasa

cuando no se incluía una etapa de calentamiento previa a la cromatografía sobre DEAE-celulosa. Estas bandas se transformaban en una sola especie enzimática al calentar a 70 °C durante 15 minutos el sobrenadante proveniente de la centrifugación del homogenato.

TABLA I.2.: Purificación de deaminasa

ETAPA	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmoles porf/mg)	UNIDADES TOTALES (nmoles porf)	PROTEINAS TOTALES (mg)	PURIF.	PORFIRINAS FORMADAS (%)		
					URO I	URO III	Decarbo xiladas
Glóbulos rojos	0,02	1.337,1	45.804	1	25	65	10
Tratamiento con solventes	1,40	1.934,0	1.381	70	98	2	
Fraccionamiento salino	1,38	1.701,0	1.232	70	100		
3. Calentamiento	3,50	1.135,2	330	175	100		
Cromatografía en Sephadex G-100							
Cromatografía en DEAE-celulosa			20	3.413*	100*		

(*) Datos correspondientes al pico de actividad.

Para la purificación representada en la tabla se partió de 150 ml de eritrocitos. Las diferentes fracciones se obtuvieron como se describe en el texto. La preparación de glóbulos rojos que fue considerada como un control de actividad inicial, se obtuvo por tres congelamientos-descongelamientos sucesivos de los glóbulos rojos lavados. El sistema de incubación y la metodología utilizada fue la descrita en Materiales y Métodos.

Más tarde, Smythe y Williams (1988) purificaron deaminasa de eritrocitos humanos, aplicando sobre los glóbulos rojos lisados un calentamiento a 80 °C durante 50 minutos y posteriormente una serie de cromatografías sobre DEAE-celulosa, Cibacron Blue F3G-A y Sepharosa G-75. Estos autores encontraron una única especie enzimática al calentar durante 50 minutos; sin embargo, si el período de calentamiento era más corto (30 minutos) se detectaban dos bandas con actividad de deaminasa. Basándose en esto, se propuso que el calentamiento convierte una de las formas enzimáticas en otra y se sugirió que estos dos picos de actividad podrían corresponder a las 2 especies principales encontradas por Anderson y Desnick (1980), o sea, la enzima nativa y el complejo enzima-monopirrol.

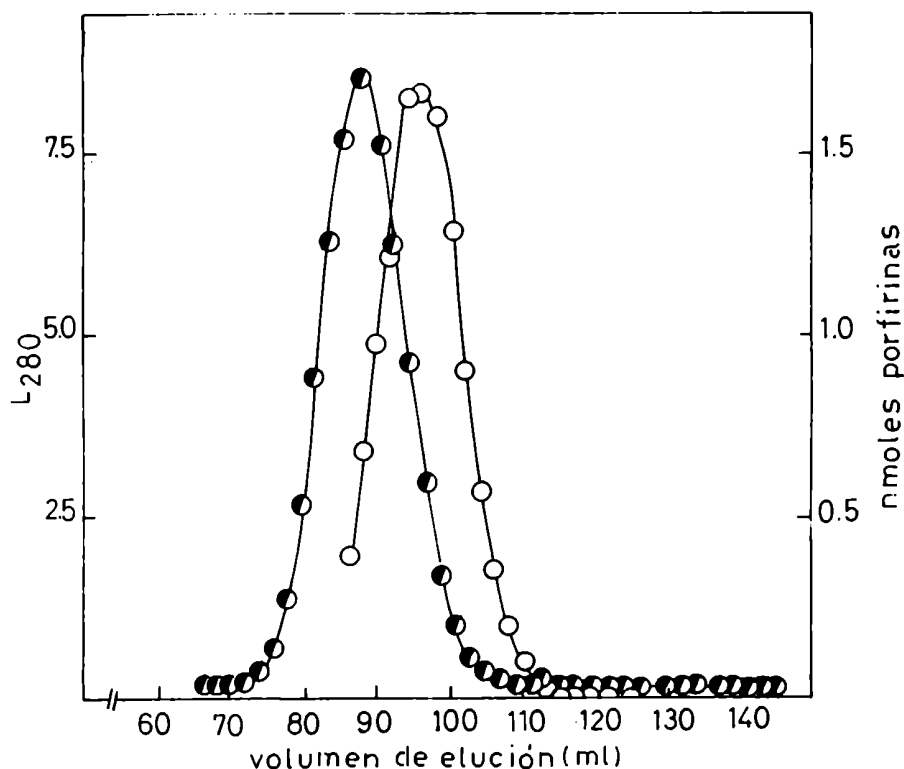


FIGURA I.1.: Perfil de elución sobre Sephadex G-100 de la deaminasa. La columna de Sephadex G-100 (2,4 x 50 cm) se equilibró y eluyó con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4. (●) Contenido proteico y (○) porfirinas formadas en los eluidos. Es necesario aclarar que aunque se representó la lectura a 280 nm, el perfil de elución de las proteínas totales determinado por Bradford (1976) fue similar.

La Figura I.2. muestra el perfil de elución sobre DEAE-celulosa de la preparación proveniente de la etapa 4 de purificación; en ella se observa un único pico de actividad enzimática. Este resultado concuerda con los trabajos de Williams (1984) y Smythe y Williams (1988) en los cuales, como se mencionó anteriormente, se encontró una única banda activa cuando las preparaciones enzimáticas estuvieron sujetas a calentamientos.

Por otra parte, destacaremos nuevamente que el tratamiento con solventes orgánicos no sólo desnaturaliza la hemoglobina sino que también inactiva las decarboxilasas y la mayor parte de la isomerasa, a tal punto que en esta etapa temprana ya se

forma un 98 % de Urogen I. Sin embargo, como se observa en la Tabla I.1., luego de un calentamiento a 65 °C por 15 y 20 minutos y a 70 °C durante 5 minutos, la pérdida de proteínas no justifica el incremento considerable en la actividad específica. Este hecho implica una activación de la deaminasa, probablemente debida a la completa separación de la isomerasa.

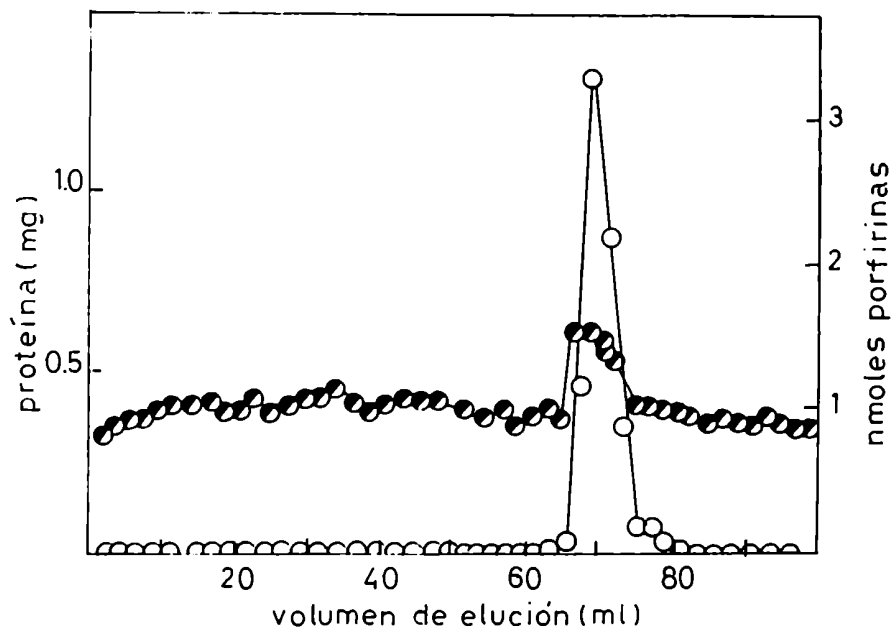


FIGURA I.2.: Perfil de elución sobre DEAE-celulosa de la deaminasa. La columna de DEAE-celulosa (2,6 x 20 cm) se equilibró con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 y las fracciones proteicas se eluyeron empleando un gradiente lineal de 0 a 0,12 M de cloruro de sodio en el mismo buffer (flujo = 22 ml/h). En los eluidos se determinó el contenido proteico (●) y las porfirinas formadas (○).

Evidentemente entonces, el tratamiento con solventes orgánicos inactiva la cosintetasa, la cual parece permanecer asociada a la deaminasa hasta la etapa de calentamiento (Smythe y Williams, 1988).

Finalmente, señalaremos que el grado de purificación total alcanzado es de 3.400 veces.

I.2. PURIFICACION DE LA PBG-asa

I.2.1. Ensayos preliminares

Hemos señalado que la eliminación de la hemoglobina por tratamiento con solventes orgánicos provoca una importante inactivación de la isomerasa (Tabla I.2.), razón por la cual este método no puede emplearse en la purificación de la PBG-asa eritrocitaria.

Llambías y Batlle (1971 a) trabajando con PBG-asa de eritrocitos de ave y Anderson y Desnick (1980) estudiando deaminasa de glóbulos rojos humanos, utilizaron una columna de DEAE-celulosa para eliminar la hemoglobina, la cual separa alrededor del 90 % de esta proteína (Anderson y Desnick, 1980). Teniendo en cuenta estos trabajos, se decidió emplear la DEAE-celulosa como primer paso en la purificación. Para ello, aproximadamente 250 ml de sangre entera se centrifugaron 15 minutos a 4.800 x g. La capa superior, constituida por el plasma, se descartó por aspiración, se separó manualmente la película de leucocitos y plaquetas y posteriormente, los glóbulos rojos se lavaron dos veces con solución fisiológica.

Con el objeto de hemolizar los eritrocitos se añadió agua a 0 °C en proporción 1:1 (Llambías y Batlle, 1971 a), colocándose todo en baño de hielo durante 1 hora, con agitación mecánica lenta. Al finalizar la lisis osmótica, se centrifugó a 25.000 x g durante 15 minutos y se filtró el sobrenadante, el cual se empleó como fuente de enzima.

Posteriormente, este sobrenadante se sembró en una columna de DEAE-celulosa (2,6 x 20 cm) previamente equilibrada con buffer fosfato de potasio 7 mM pH 6,8 (Anderson y Desnick, 1980) y se procedió a separar la hemoglobina por pasaje del mismo buffer a un flujo de 10 ml/h. Sin embargo, no se logró el objetivo propuesto debido a que el flujo disminuyó significativamente, a pesar de que se trató de mantener la presión con una bomba peristáltica. Teniendo en cuenta este inconveniente operativo y la extrema labilidad de la isomerasa, se procuró acelerar el proceso ensayando adsorber la enzima al mismo gel, pero en batch.

El primer punto a establecer fue el tiempo de contacto más apropiado entre el gel y "la fracción enzimática." Con este fin el sobrenadante se agregó a la DEAE-celulosa.

resuspendida en buffer fosfato de potasio 7 mM pH 6,8 (relación 1:1), dejando la mezcla con agitación mecánica muy lenta por 40 y 100 minutos (Tabla I.3.; sobrenadante Batch 40 min y 100 min). Seguidamente se eliminó la hemoglobina ocluída por el gel realizando varios lavados consecutivos con el mismo buffer, hasta ausencia de coloración rosada y lectura a 280 nm constante.

TABLA I.3.: Ensayos preliminares en la purificación de PBG-asa

FRACCION	PORFIRINAS		PROTEINAS		UNIDADES TOTALES
	nmoles	nmoles/mg	mg/ml	totales	
Hemolizado	0,90	0,02	238,50	30.051,0	601
Sob.batch 40'	0,09	0,00	120,92	-	-
Sob.batch 100'	0,07	0,00	97,80	-	-
Lavado 1	0,33	3,51	0,47	125,3	280
Lavado 2	0,17	2,43	0,35	93,3	144
Lavado 3	0,09	1,61	0,28	74,7	72
Lavado 4	0,06	2,00	0,15	25,5	51

Las preparaciones conteniendo la enzima se obtuvieron como se describe en el texto. El sistema y las condiciones de incubación, así como la metodología empleada fueron los usuales.

Con el objeto de desadsorber la enzima se efectuaron 4 lavados sucesivos con el mismo buffer, al cual se le incrementó la fuerza iónica por agregado de cloruro de sodio 0,12 M. En cada uno de ellos se determinó actividad enzimática (Tabla I.3., lavados 1, 2, 3 y 4).

Posteriormente, los lavados se reunieron y precipitaron al 90 % con sulfato de amonio.

De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla I.3. se puede concluir que 40 minutos de contacto entre la PBG-asa y la DEAE celulosa es suficiente para una buena adsorción, pues no se detecta actividad enzimática en la fracción sobrenadante.

Por otra parte, podemos asegurar que los 3 primeros lavados con alta fuerza iónica desadsorben la mayor cantidad de enzima, ya que las unidades enzimáticas obtenidas en el cuarto lavado son un pequeño porcentaje de las iniciales y su incorporación a la fracción total de lavados sólo causaría una dilución considerable sin incremento apreciable en el rendimiento.

Llambías y Batlle (1971 a) reportaron como paso de purificación de la PBG-asa de eritrocitos de ave, una diálisis de la solución proteica contra agua destilada (relación 1:200) por 24 horas, la cual produce una purificación de 1,5 veces. Sin embargo, cuando el precipitado 0 - 90 % de saturación con sulfato de amonio proveniente de eritrocitos humanos, se dializó en idénticas condiciones, se produjo una inactivación de la enzima cercana al 94 % (Tabla I.4., sobrenadante de diálisis). Probablemente, este tratamiento sea muy drástico para esta PBG-asa, lo cual nos sugeriría que la estabilidad de la enzima de glóbulos rojos humanos es menor que la de eritrocitos de ave.

TABLA I.4.: Ensayos preliminares en la purificación de PBG-asa

FRACCION	PORFIRINAS		PROTEINAS		UNIDADES TOTALES
	nmoles	nmoles/mg	mg/ml	totales	
Hemolizado	0,90	0,02	238,50	30.051,0	510
0 - 90 %	1,13	1,35	4,19	289,1	467
Sob.diálisis	0,17	0,08	11,04	34,2	3
30 - 50 %	3,27	4,62	3,54	47,3	218
50 - 70 %	1,99	1,49	6,69	131,8	196
70 - 90 %	0,14	0,39	1,78	24,5	10

Las preparaciones conteniendo enzima se obtuvieron como se describe en el texto. El sistema y las condiciones de incubación, así como la metodología empleada fueron los usuales.

En último término, se investigó el rango de saturación con sulfato de amonio que concentraba la mayor parte de unidades

enzimáticas (Tabla I.4.). Operativamente se trabajó de la siguiente manera: la fracción 0 - 90 %, que contenía los lavados 1, 2, 3 y 4 (Tabla I.3.), se desaló por cromatografía sobre Sephadex G 25 gueso (Tabla I.4., fracción 0 - 90 %). Luego se realizaron precipitaciones secuenciales con esta sal, obteniéndose las fracciones 30 - 50 %, 50 - 70 % y 70 - 90 %, las cuales se desalaron separadamente con el objeto de determinar la actividad enzimática en cada una de ellas (Tabla I.4.). Analizando los resultados se comprueba que el rango 30 - 50 % de saturación es el que contiene la mayor parte de las unidades enzimáticas (%), mientras que en la fracción 50 - 70 % se encuentra un 46 % de las mismas y la 70 - 90 % contiene tan sólo un 2 %. De acuerdo a estos hallazgos se decidió realizar un fraccionamiento 30 - 70 % con sulfato de amonio, en el que se recupera el 98 % de la actividad enzimática.

I.2.2. Purificación de la PBG-asa

Finalizados los ensayos preliminares, la secuencia establecida fue la siguiente (Tabla I.5.); todas las operaciones se realizaron a 4 °C.

Etapa 1: Hemólisis: los eritrocitos humanos se sometieron a una lisis osmótica siguiendo el procedimiento ya detallado (Item I.2.1.).

Etapa 2: Tratamiento con DEAE-celulosa en batch: la solución hemolizada se puso en contacto con DEAE-celulosa resuspendida en buffer fosfato de potasio 7 mM pH 6,8 (relación 1:1), la mezcla se sometió a una agitación mecánica muy lenta durante 40 minutos. Posteriormente se eliminó la hemoglobina ocluída por el gel realizando varios lavados consecutivos (aproximadamente 6) con el mismo buffer, hasta lectura a 280 nm constante. En último término se lavó el gel 3 veces con buffer de alta fuerza iónica (relación 1:1) (buffer fosfato de potasio 7 mM pH 6,8 con cloruro de sodio 0,12 M), con el objeto de adsorber las proteínas iónicas eritrocíticas. Para favorecer el proceso de liberación de la enzima del gel, en cada lavado se dejó en contacto la DEAE-celulosa con el buffer durante 20 minutos en baño de hielo con agitación mecánica muy lenta. Al finalizar cada lavado se centrifugó a 4.800 x g durante 15 minutos, guardándose la fracción sobrenadante y sometiendo el gel a un nuevo lavado.

Etapa 3: Fraccionamiento salino: Los lavados se reunieron y se concentraron con sulfato de amonio (30 - 70 % de saturación). Para determinar la actividad enzimática de esta fracción se eliminó el amonio por cromatografía en Sephadex G-25 grueso.

Etapa 4: Cromatografía en Sephadex G-100: la fracción 30 - 70 % de saturación sin desalar se resuspendió en un mínimo volumen de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,2 - 8,3 y se sembró sobre una columna de Sephadex G-100 previamente equilibrada con el mismo buffer. La Figura I.3. muestra el perfil de elución de la PBG-asa eritrocitaria.

TABLA I.5.: Purificación de la PBG-asa

ETAPA	PORFIRINAS		PROTEINAS		UNIDADES TOTALES	PURIF.	PORFIRINAS FORMADAS (%)	
	nmoles	nmoles/mg	mg/ml	totales			URO I	URO III
1. Hemólisis	1,43	0,04	182,16	49.183,2	1.967	1		100
2. DEAE-celulosa	,59	8,19	0,36	284,3	2.327	205		100
3. Fraccionamiento salino			0,97	214,2	1.833	215		100
4. Cromatografía en Sephadex G-100		37,86	0,14	160,8	1.150	947		100

Las preparaciones correspondientes a cada etapa se obtuvieron como se detalla en el texto. La actividad enzimática correspondiente a la cromatografía sobre Sephadex G-100, es la determinada en el pico de producto formado (Figura I.3.).

Las condiciones y sistema de incubación, así como la metodología utilizada fueron las descritas en Materiales y Métodos.

La Tabla I.5. presenta los resultados correspondientes a la purificación. Del análisis de los mismos concluimos que la etapa que produce el mayor grado de purificación es la de la eliminación de la hemoglobina; esto es lógico si consideramos que esta proteína es la que se encuentra en mayor proporción en el eritrocito. En cuanto al grado total de purificación (950 veces) indicaremos que si bien es menor que el alcanzado para la PBG-asa

de eritrocitos de ave (Llambías y Batlle, 1971 a), debe señalarse que es totalmente reproducible, de manejo operativo sumamente simple y además, mantiene el 100 % de actividad del complejo PBG-asa, lo cual es muy importante dada la notable labilidad de la isomerasa.

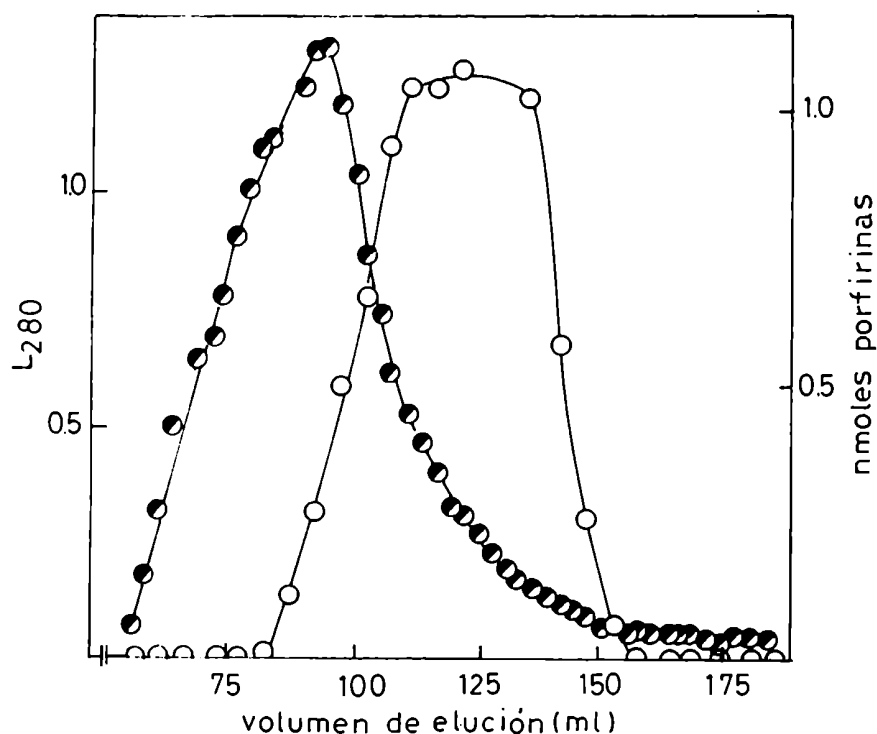


FIGURA I.3.: Perfil de elución en Sephadex G-100 de la PBG-asa. La columna (2,4 x 45 cm) se equilibró con buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2 - 8,3. La proteína se eluyó con el mismo buffer a un flujo de 20 - 22 ml/h. En los eluidos se determinó el contenido proteico (●) y la formación de porfirinas (○).

I.3. DETERMINACION DE LOS PESOS MOLECULARES

Con el objeto de determinar el PM de la deaminasa y PBG-asa de glóbulos rojos, se calibraron las columnas de Sephadex G-100 con una serie de proteínas patrones (ver Materiales y Métodos). En la Figura I.1. se representa el perfil de elución de la deaminasa; en ella se observa un único pico de actividad que

corresponde a un PM de 37.000 ± 3.700 . Este valor concuerda con los reportados para la enzima proveniente de la misma fuente (Miyagi y col., 1979; Anderson y Desnick, 1980) y de otros tejidos (Llambías y Batlle, 1971 a, b; Jordan y Shemin, 1973; Higuchi y Bogorad, 1975; Sancovich y col., 1976; Kreutzer y col., 1977; Rossetti y col., 1980; Williams y col., 1981; Williams, 1984). Sin embargo, Frydman y Feinstein (1974) encontraron un PM de 25.000 ± 2.500 para la deaminasa de eritrocitos humanos, obtenido por un procedimiento similar al empleado por Anderson y Desnick (1980).

Por otra parte, Smythe y Williams (1988) purificaron deaminasa de glóbulos rojos humanos y determinaron su PM aplicando diferentes metodologías. Es así que reportaron un valor de 44.000 determinado por electroforesis en SDS, cromatografía en Sephadex G-75 y también por HPLC en una columna Waters Protein Pak 125. En este último caso el PM varió de 44.000 a 30.000 según se emplease como buffer de elución Tris-HCl 50 mM pH 7,8 o fosfato de sodio 100 mM pH 7,2 respectivamente. De acuerdo a esto, los autores propusieron que este comportamiento anómalo podría atribuirse a interacciones entre la enzima y los grupos cargados del gel, lo que retardaría la elución de la proteína dando así un PM aparentemente menor.

Estos resultados permitirían explicar el bajo PM encontrado por Frydman y Feinstein (1974) para la enzima de eritrocitos humanos ya que, a diferencia de Anderson y Desnick (1980), emplearon para la elución de la proteína buffer fosfato de sodio sin el agregado de sales, las que al aumentar su fuerza iónica impedirían el retraso en la salida de la enzima.

Por otro lado, Rossetti y col. (1980) encontraron una proteína pequeña, de PM 20.000, con actividad de deaminasa en fracciones solubles y particuladas de *Euglena gracilis*. Sin embargo, en este caso la especie de menor PM no era la única, sino que acompañaba a la forma enzimática principal de PM 40.000; y más aún, en algunas oportunidades, que dependían del procedimiento de purificación utilizado, la enzima de mayor PM era la única especie presente. En base a estos hallazgos, como se mencionó anteriormente, Rossetti y col. (1980) propusieron que, en solución, la deaminasa existiría normalmente como un dímero compuesto por dos subunidades idénticas de PM 20.000 y que, en algunos organismos, la enzima activa sería el monómero y en otros, el

dímero, lo cual dependería no sólo de la fuente sino también de la metodología empleada en el transcurso de la purificación.

Paralelamente, y de manera análoga a la deaminasa se estimó el PM de la PBG-asa (Figura I.3.), el cual resultó ser de 23.000 ± 2.300 . Es de hacer notar que en ensayos previos, en los cuales se empleó cromatografía en Sephacryl, no se detectó actividad enzimática en los eluidos de la columna. Este hecho estaría en total acuerdo con el pequeño tamaño molecular hallado ya que este gel discrimina proteínas en el rango de 50.000 a 250.000.

Como ya hemos mencionado, el PM de este complejo enzimático varía ampliamente según el organismo en estudio. Así, Llambías y Batlle (1971 a) purificaron la PBG-asa de eritrocitos de ave siguiendo un esquema similar al empleado en este trabajo, y determinaron por cromatografía en Sephadex G-100 un PM muy superior (110.000 ± 11.000), similar al hallado por Juknat (1983) para la enzima de *Rp. palustris*.

Por otro lado, Sancovich y col. (1969 a) estimaron para la PBG-asa de hígado bovino un PM análogo al encontrado por nosotros para la proteína de hígado porcino.

Sin embargo, Llambías y Batlle (1971 b) reportaron también un valor de 25.000 para la enzima de callos de soya.

Asimismo, Rossetti y col. (1986) trabajando con fracciones solubles y particuladas de *E. gracilis*, hallaron que en esta fuente, junto a la forma enzimática principal de PM 50.000 eluía una proteína con actividad de PBG-asa cuyo PM se estimó en 25.000.

Finalmente, nos parece llamativo y a la vez interesante señalar la similitud entre el PM hallado por Frydman y Feinstein (1974) para deaminasa de glóbulos rojos humanos y el estimado en este trabajo para la PBG-asa de la misma fuente. Teniendo presente que la metodología empleada en ambos casos es análoga y que estos autores no sometieron la preparación enzimática a calentamiento es muy probable que en los eluidos de la columna de Sephadex G-100 existiese isomerasa inactiva pero aún asociada a la deaminasa (Smythe y Williams, 1988).

Aparentemente, la isomerasa parecería estabilizar una forma enzimática con actividad de deaminasa de bajo PM, mientras que en ausencia de cosintetasa la HMB-sintetasa se hallaría en

solución formando un agregado de mayor tamaño.

Asimismo señalaremos, que las electroforesis realizadas con las fracciones conteniendo deaminasa y PBG-asa, provenientes de las últimas etapas de purificación, nos permitieron estimar PM's que confirmaron los ya mencionados, pues la deamina sa motró un PM de 38.000 daltons y el complejo enzimático presentó uno de 25.000 daltons.

CAPITULO II

PROPIEDADES Y ESTUDIOS CINETICOS

	Página
II.1. Propiedades de la deaminasa y PBG-asa	189
II.1.1. Estudio de la variación de la actividad enzimática con la atmósfera y la presencia de sales	189
II.1.2. Efecto de la concentración enzimática sobre la actividad	191
II.1.3. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática	191
II.1.4. Efecto del pH	194
II.2. Estudios cinéticos	195
II.2.1. Cinética de la deaminasa	195
II.2.2. Cinética de la PBG-asa	200
II.2.3. Estequiometría de la reacción	204

II. PROPIEDADES Y ESTUDIOS CINÉTICOS

II.1. PROPIEDADES DE LA DEAMINASA Y PBG-asa

II.1.1. Estudio de la variación de la actividad enzimática con la atmósfera y la presencia de sales

Ya hemos señalado que en la mayoría de las fuentes la deaminasa y PBG-asa parecen ser igualmente activas en ausencia y en presencia de oxígeno (Bogorad, 1958 a, b; Lockwood y Benson, 1960; Sancovich y col., 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a; Juknat, 1983; Araujo y col., 1987; Kotler y col., 1987 a). Sin embargo, en callos de soya y en *Euglena gracilis* la actividad enzimática se ve afectada significativamente por la presencia de aire; en estos casos las porfirinas se forman solamente bajo condiciones anaeróbicas, mientras que el consumo de PBG no se modifica seriamente al variar la atmósfera (Llambías y Batlle, 1971 b; Stella y col., 1971; Rossetti y Batlle, 1977).

Por otra parte, Llambías y Batlle (1971 b), Sancovich y col. (1976) y más recientemente Clement y col. (1982) reportaron que la presencia de sales de sodio y magnesio en ciertas concentraciones ocasiona un efecto activante, probablemente debido a un fenómeno de asociación-disociación. Asimismo, Cornford (1964) observó que cambios en la composición salina afectan la síntesis de porfirinas a partir de PBG.

De esta manera se decidió investigar el efecto de la presencia de oxígeno, así como también la acción del agregado de sales de sodio y magnesio a la mezcla de incubación, sobre la actividad de la deaminasa y PBG-asa eritrocíticas (Tabla II.1.). Contra lo esperado, se detectó actividad sólo bajo condiciones aeróbicas, ya que prácticamente no se midió consumo de sustrato ni formación de producto en anaerobiosis. Estos resultados son diferentes a los reportados anteriormente, debido a que generalmente se acepta que la condensación del PBG a urogen's sería un proceso favorecido por condiciones anaeróbicas. Sin embargo, nuestros hallazgos hacen suponer que las enzimas de eritrocitos humanos parcialmente purificadas poseen un requerimiento estricto por el oxígeno.

Si bien esta propiedad es poco común, señalaremos que

otros autores han medido la actividad de la deaminasa de glóbulos rojos humanos solamente en presencia de oxígeno (Cornford, 1964; Frydman y Feinstein, 1974; Miyagi y col., 1979; Anderson y Desnick, 1980; Smythe y Williams, 1988), sin investigar el efecto de la anaerobiosis.

TABLA II.1.: Efecto de la atmósfera y la presencia de sales sobre la actividad enzimática

ENZIMA	ATMOSFERA	NaCl-MgCl ₂	ACTIVIDAD ESPECIFICA		PORFIRINAS FORMADAS (%)	
			nmoles porf/mg	nmoles PBG cons/mg	URO I	URO III
Deaminasa	Aeróbica		2,67	5,5	94	6
			3,82	7,9	94	6
	Anaeróbica		0,45	1,0		
			0,38	1,0		
	Aeróbica		10,82	56,3		100
			11,03	57,9		100
	anaeróbica		1,70	10,2		100
			1,33	9,9		100

Se emplearon como preparaciones enzimáticas una fracción purificada 180 veces para la deaminasa (5,85 mg proteína/ml) y 220 veces para la PBG-asa (0,43 mg proteína/ml). El sistema de incubación contenía: enzima (0,2 ml), PBG (60 µg = 265,5 nmoles), se agregó o no una mezcla de cloruro de sodio 1,7 M: cloruro de magnesio 0,12 M (7:3) (0,17 ml), alcanzándose un volumen final de 1 ml con el buffer usual de incubación. La mezcla se incubó en las diferentes atmósferas durante 1 hora a 37 °C, en oscuridad y agitación constante. Para las incubaciones anaeróbicas se emplearon tubos de Thunberg.

Analizando ahora el efecto de la adición de la mezcla cloruro de sodio - cloruro de magnesio al sistema de incubación, nuevamente hallamos un comportamiento poco común y diferente del reportado para callos de soya e hígado bovino. La actividad de la deaminasa aeróbica es 30 % menor en presencia de las sales, en las mismas concentraciones que producen un efecto activante sobre las enzimas de las otras fuentes. Por otro lado, debe

señalarse que Juknat (1983) observó que estas sales pueden o no estimular la actividad enzimática dependiendo de los niveles de PBG presentes en el medio de incubación. Esta última posibilidad se investigó con las enzimas eritrocíticas, detallándose los resultados más adelante.

II.1.2. Efecto de la concentración enzimática sobre la actividad

La Figura II.1. muestra el efecto de la concentración enzimática sobre la actividad de la deaminasa (A) y PBG-asa (B) de eritrocitos humanos. En ella se observa que, para ambas enzimas, las porfirinas formadas aumentan linealmente con la concentración proteica, mientras que el sustrato consumido alcanza un máximo rápidamente y luego se mantiene constante, a pesar de que todavía queda entre un 40 y 50 % del PBG agregado inicialmente. Este efecto ha sido observado en enzimas provenientes de otras fuentes (Rossetti, 1978; Juknat, 1983) y puede justificarse si recordamos que la deaminasa y la PBG-asa necesitan un exceso de sustrato de por lo menos 4 y hasta 10 veces el estequiométricamente necesario; entonces podría suceder que a las concentraciones proteicas en las que se alcanza el plateau, se hubiese utilizado la mayor cantidad de PBG disponible para dar lugar a la formación de intermediarios polipirrólicos.

II.1.3. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática

En la Figura II.2. se representa la respuesta de la deaminasa (A) y la PBG-asa (B) eritrocíticas al avanzar el tiempo de reacción, observándose que la formación de uroporfirinas es lineal hasta las 2 horas, no detectándose una fase lag. Estos resultados concuerdan con los reportados por Frydman y Feinstein (1974), Anderson y Desnick (1980) y Smythe y Williams (1988) para la deaminasa de la misma fuente. Sin embargo, estos últimos autores hallaron un lag en la formación de urogens con el tiempo cuando la reacción se detenía por agregado de iodo en lugar de TCA, determinando en este caso un estado transiente de 7 minutos a pH 8,3. Este resultado sería consistente con la formación del intermediario HMB por la deaminasa de glóbulos rojos, como había sido previamente demostrado para la enzima de *E. gracilis* (Battersby y col., 1982).

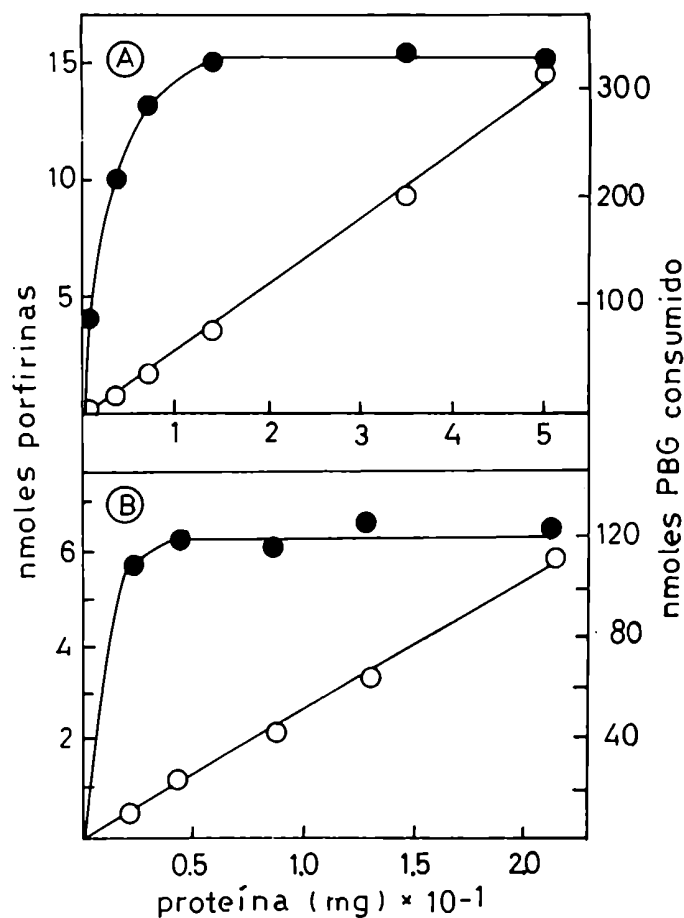


FIGURA II.1.: Efecto de la concentración enzimática sobre la actividad. Se empleó la preparación enzimática proveniente del calentamiento como fuente de deaminasa (A) (4,96 mg/ml) y la fracción 30-70 % de saturación convenientemente desalada para determinar actividad de PBG-asa (B) (0,43 mg/ml). Sistemas de incubación: deaminasa: cantidades variables de proteína, PBG (120 μ g = 531 nmoles) y buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 hasta completar 1 ml de volumen final; PBG-asa: cantidades variables de proteína, PBG (60 μ g = 265 nmoles) y buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,2-8,3 hasta volumen final de 1 ml. El resto de la metodología se describe en Materiales y Métodos.
(○) porfirinas formadas,
(●) PBG consumido.

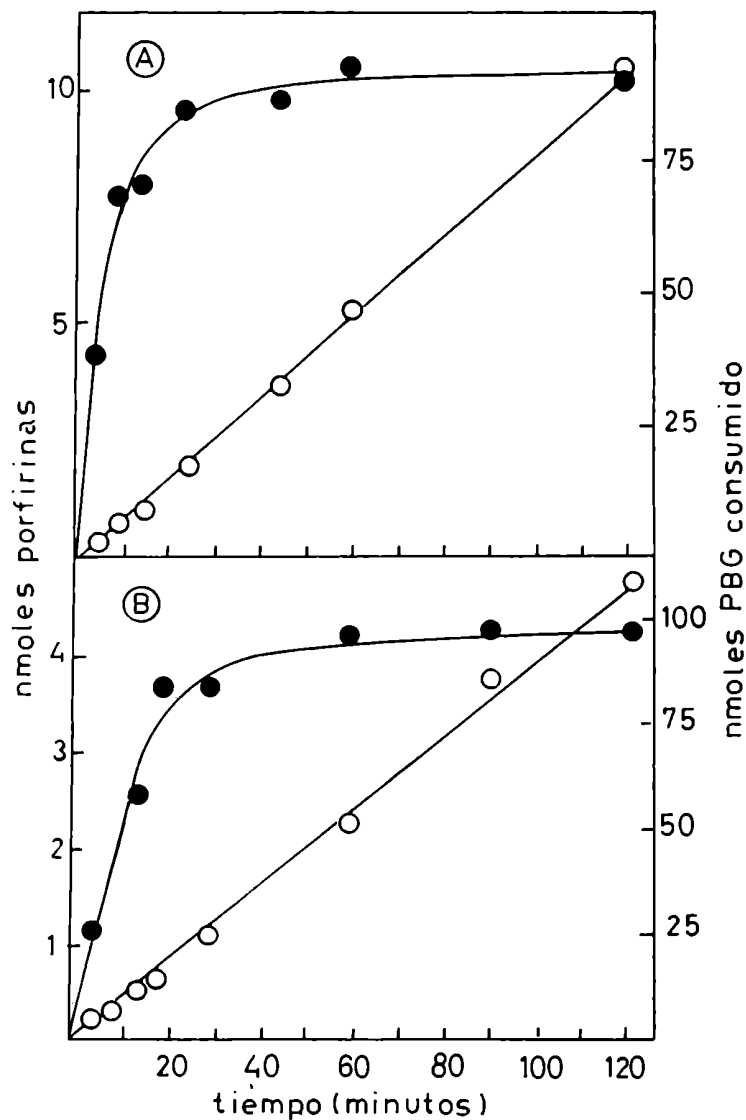


FIGURA II.2.: Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática. Como fuente de deaminasa (A) se empleó el sobrenadante de calentamiento (5,02 mg/ml) y para la medición de la actividad de PBG-asa (B) se utilizó la fracción 30-70 % de saturación convenientemente desalada (0,43 mg/ml). Los sistemas de incubación fueron los usuales. Se incubó en oscuridad a 37 °C, con agitación constante y por períodos de tiempo variables, según se indica.
 (○) Porphirinas formadas,
 (●) PBG consumido.

Por otra parte, al analizar el consumo de PBG (Figura II.2.) se observa que éste alcanza un máximo dentro de los 30 - 40 minutos para ambas enzimas, no existiendo un consumo adicional de sustrato al aumentar el tiempo hasta dos horas. Este comportamiento es similar al encontrado en *E. gracilis* (Rossetti, 1978) e hígado porcino (Fumagalli, presente Tesis) y varía ligeramente del reportado para callos de soya (Stella y col., 1971), pues en este tejido se observó que el 90 % del PBG se consume dentro de los 60 minutos. No obstante, Frydman y Feinstein (1974) demostraron trabajando con deaminasa de glóbulos rojos humanos, que el consumo de sustrato es lineal hasta las 2 horas. Esta importante discrepancia con nuestros hallazgos podría deberse a diferencias en la cantidad y/o en la actividad enzimática, de las cuales los otros autores no han dado información.

Asimismo, señalaremos que el incremento en el tiempo de incubación no afecta el tipo isomérico de las uroporfirinas formadas.

Analizando comparativamente las gráficas de formación de producto y consumo de sustrato, se observa una pendiente mucho más pronunciada para la desaparición de PBG. Al igual que en el caso de hígado porcino, podríamos especular que existe un consumo inicial muy rápido de sustrato, para dar lugar a la formación de intermediarios polipirrólicos de diferente longitud, los cuales se acumulan y finalmente se transforman lenta y linealmente en uroporfirinógenos. Esta suposición estaría en total acuerdo con el mecanismo de reacción propuesto por Battersby y col. (1982).

II.1.4. Efecto del pH

La variación de la actividad enzimática con el pH se halla representada en la Figura II.3.; nuevamente la parte A corresponde a la deaminasa y la B a la PBG-asa eritrocíticas.

Del análisis de la Figura II.3.A surge un pH óptimo de 7,4 cuando se utiliza buffer Tris-HCl y otro cercano a 8 en buffer fosfato de sodio. Sin embargo, la deaminasa es un 15 % más activa en buffer Tris-HCl; por este motivo se decidió emplear éste como buffer de incubación durante el presente estudio. Analizando el perfil de actividad, se observa una pérdida casi total de la misma por debajo de pH 6 y por encima de 9. Asimismo, es

necesario señalar que la forma de la curva de pH obtenida en base al consumo de PBG es similar a la presentada.

El valor de pH al cual se manifiesta la máxima actividad de la deaminasa de eritrocitos humanos, se halla dentro de los límites encontrados para esta enzima en otras fuentes (Batlle y Rossetti, 1977) y es similar a los reportados previamente para el mismo tejido (Frydman y Feinstein, 1974; Anderson y Desnick, 1980; Smythe y Williams, 1988).

En la Figura II.3.B se representa el perfil de actividad de la PBG-asa en función del pH. Esta enzima parecería ser mucho más lábil que la deaminasa a pH's inferiores a 6 y superiores a 9, pues prácticamente no se detecta actividad a estos pH's. Además, se observa una actividad mucho mayor en buffer Tris-HCl que en buffer fosfato de sodio, si bien el pH óptimo coincide en ambos pues es de 8,2 para el primero y cercano a 8 para el segundo.

Al igual que en el caso de la deaminasa, el consumo de PBG presentó un perfil similar al determinado en base a la formación de porfirinas.

II.2. ESTUDIOS CINETICOS

II.2.1. Cinética de la deaminasa

En la Figura II.4. se representa la velocidad en función de la concentración de PBG para la deaminasa de eritrocitos. En ella se observa un comportamiento aparentemente michaeliano cuando se determina la velocidad de formación de producto y de consumo de PBG. Sin embargo, a concentraciones de sustrato superiores a 400 μ M se detecta una inhibición en la formación de urogen mientras que la desaparición de PBG no se ve afectada.

No obstante estos hallazgos, el gráfico de dobles recíprocas (Figura II.5.) para las uroporfirinas formadas no es lineal, indicando la existencia de cooperatividad positiva a bajas concentraciones de PBG. Esta interacción se ve corroborada por un n de Hill cercano a 2 (Figura II.5. inset), lo que sugeriría la existencia de dos sitios de unión interactuantes para el PBG por molécula de enzima.

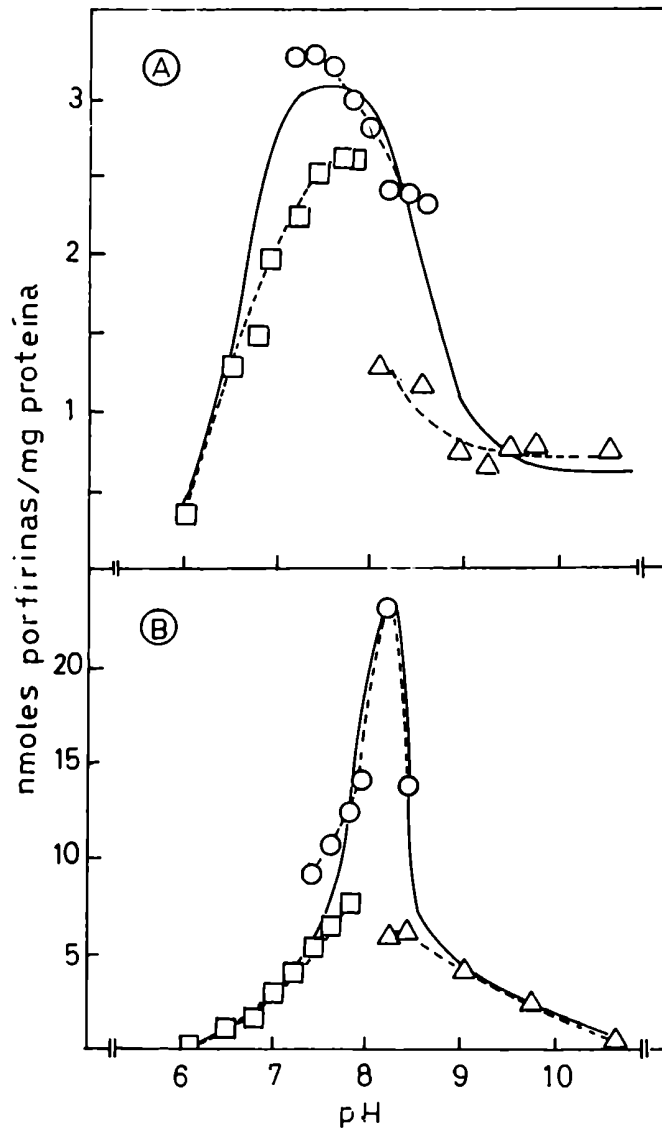


FIGURA 11.3.: Efecto del pH.
 La preparación enzimática conteniendo deaminasa (A) fue la proveniente del sobrenadante de calentamiento; para PBG-asa se empleó la fracción 30-70 % de saturación previamente desalada. Los sistemas de incubación contuvieron: enzima (0,2 ml), PBG (60 μ g = 265,5 nmoles) y buffers 0,05 M de diferentes pH's según se indica hasta un volumen final de 1 ml. Las incubaciones se llevaron a cabo bajo condiciones standard. Los métodos empleados fueron los usuales. En el gráfico se representan las incubaciones realizadas en buffer fosfato de sodio (Δ), Tris-HCl (\circ) y glicina-NaOH (\square). Las curvas son parciales (---) y totales (—).

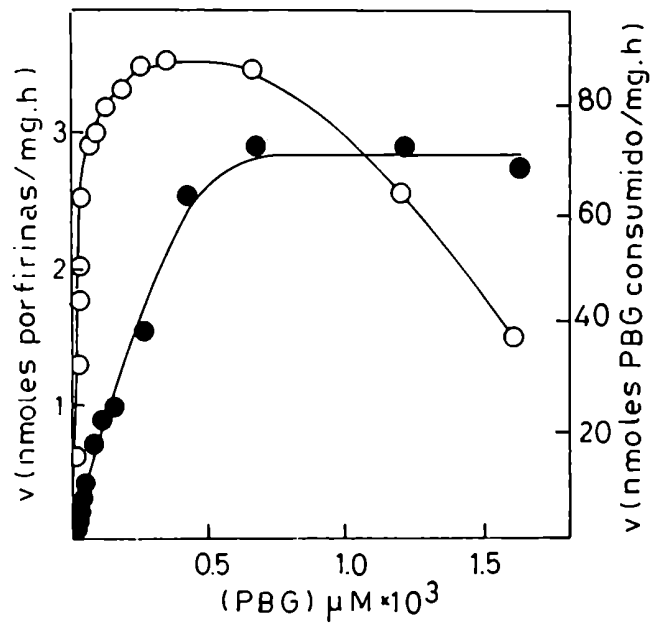


FIGURA II.4.: Gráfico de Michaelis-Menten para la deaminasa.

Se empleó como fuente enzimática una preparación purificada 180 veces. El sistema de incubación contuvo: enzima (0,2 ml), PBG en concentraciones variables (2,6 a 1.590 μM) y buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 hasta volumen final de 1 ml. El resto de la metodología utilizada fue la usual.
(○) porfirinas formadas, (●) PBG consumido.

Sin embargo, cuando se determina la velocidad en base al sustrato consumido el gráfico de Lineweaver-Burk es lineal.

Los valores de las constantes cinéticas determinadas a partir de estos gráficos son: $K_m = 22 \mu\text{M}$ y $V_{max} = 3 \text{ nmoles/mg.h}$ para la formación de porfirinas, los cuales están dentro del rango reportado para la enzima de la misma fuente y de otros tejidos (Batlle y Rossetti, 1977).

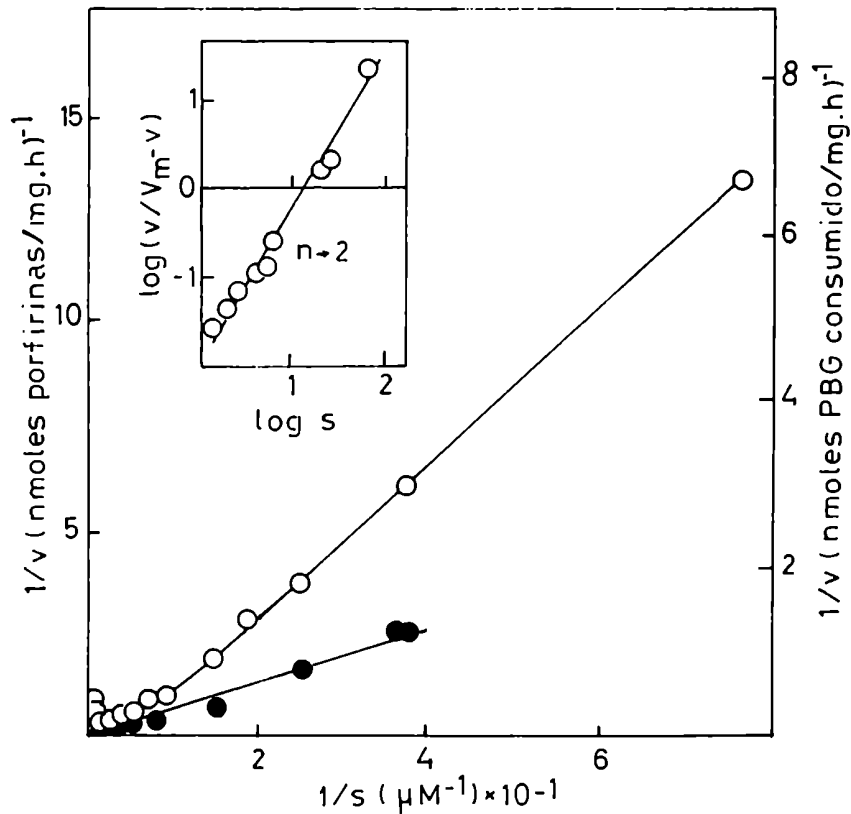


FIGURA II.5.: Gráfico de Lineweaver-Burk para la deaminasa.
 Los detalles experimentales son los indicados en la leyenda de la Figura II.4.
 En el Inset se determina el n de Hill; es necesario señalar que las V_{max} empleadas en la estimación del mismo son las que surgen del gráfico de las inversas.

Ya hemos mencionado que Hensley y col. (1981) demostraron, trabajando con aspartato transcarbamilasa, que los gráficos cinéticos comúnmente empleados no son lo suficientemente sensibles como para detectar efectos homotrópicos leves. Por este motivo los autores sugieren representar velocidad/(sustrato) vs. velocidad y analizar dicho gráfico al estudiar el comportamiento cinético de una enzima, el cual es lineal para una cinética michaeliana y presenta forma de campana cuando existen efectos homotrópicos. De acuerdo a lo expuesto, la Figura II.6. sostiene la idea de que la deaminasa de eritrocitos humanos puede tener dos

sitios de unión para su sustrato aunque la interacción positiva no parecería ser muy fuerte.

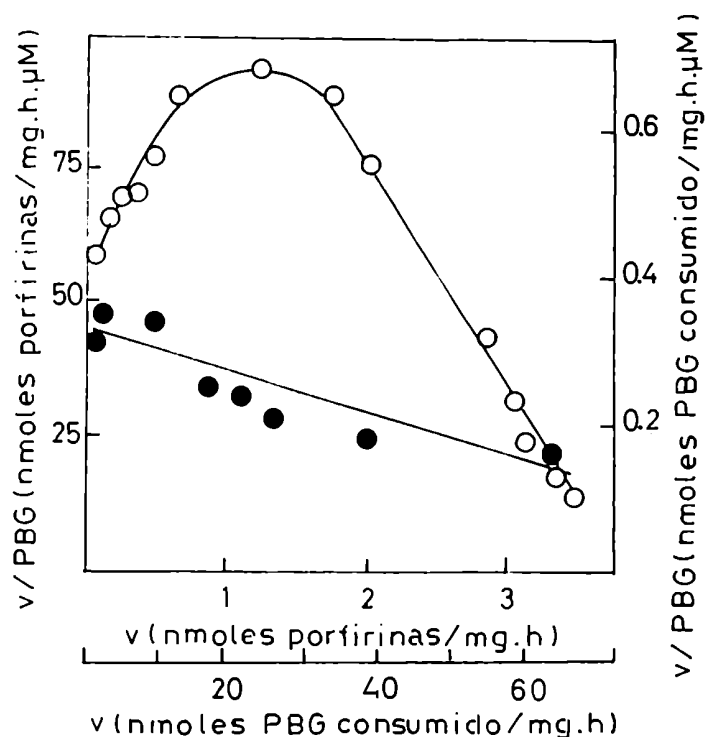


FIGURA II.6.: Representación de Eadie para deaminasa. Los detalles experimentales son los indicados en la leyenda de la Figura II.6.

Estos resultados han sido muy llamativos ya que en la mayoría de las fuentes la deaminasa siempre presentó un comportamiento michaeliano (Sancovich y col., 1969 a, b; Frydman y Frydman, 1970; Llambías y Batlle, 1971 a; Jordan y Shemin, 1973; Williams y col., 1981; Williams, 1984). Sin embargo, debemos resaltar que en muchos de estos trabajos no se encuentran los gráficos de inversas y en ninguno de ellos, se efectuaron las representaciones de Eadie. Por otra parte, comparando los resultados con los correspondientes a la enzima homóloga (Frydman y Feinstein, 1974; Anderson y Desnick, 1980 y Smythe y Williams, 1988) podemos señalar que el rango de concentraciones de PBG empleados en estos trabajos no es tan amplio como el examinado en el presente estudio, razón por la cual pudo no haberse detectado la inhibición por

sustrato a concentraciones superiores a $400 \mu\text{M}$, así como tampoco los efectos cooperativos leves para valores de PBG inferiores a $7 \mu\text{M}$.

Por último señalaremos que la deaminasa de callos de soya también presentó un comportamiento cinético diferente del reportado para otras fuentes, ya que mostró una cooperatividad negativa con curvas de saturación inusuales y gráficos de inversas no lineales y bimodales (Llambías y Batlle, 1970 a, b).

II.2.2. Cinética de la PBG-asa

Los estudios cinéticos realizados con la PBG-asa de eritrocitos humanos, evidenciaron un comportamiento michaeliano (Figura II.7.) tanto al considerar la velocidad de formación de producto así como también la de consumo de PBG. Este hecho se corrobora con un gráfico de inversas lineal y un n de Hill cercano a uno (Figura II.8.). Por otra parte, la representación de Eadie (Figura II.9.) demuestra la ausencia de efectos homotrópicos leves. Esta cinética concuerda con la reportada por Frydman y Feinstein (1974) para la enzima homóloga, pero difiere del comportamiento alostérico encontrado en hígado vacuno (Sancovich y col., 1969 a, b), eritrocitos de ave (Llambías y Batlle, 1971 a, b); callos de soya (Llambías y Batlle, 1970 a, b), *Euglena gracilis* (Rossetti y col., 1987) y *Rp. palustris* (Juknat, 1983).

Los valores de las constantes cinéticas aparentes calculados en base al producto formado son: $V_{\text{max}} = 40 \text{ nmoles porf./mg.h}$ y $K_m = 35 \mu\text{M}$. Estos parámetros están dentro del orden de aquellos encontrados para la enzima homóloga y la de otras fuentes.

Este comportamiento cinético diferencial entre la deaminasa y el complejo PBG-asa parecería indicar que en ausencia de isomerasa, la deaminasa exhibe cierto grado de cooperatividad positiva o sea, la unión de la primer molécula de PBG favorece la entrada de la segunda en otro sitio. Sin embargo, cuando se arma el complejo, la isomerasa induciría un cambio conformacional sobre la deaminasa que conduciría a la pérdida de los efectos homotrópicos y en consecuencia a un comportamiento típicamente michaeliano.

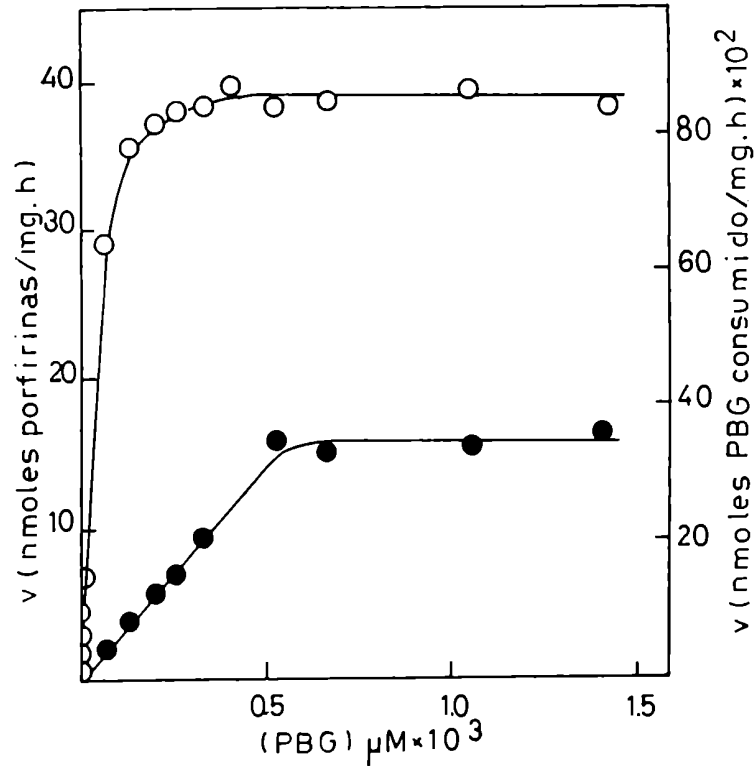


FIGURA II.7.: Gráfico de Michaelis-Menten para la PBG-asa.

Se empleó una fracción purificada 215 veces (0,43 mg/ml). El sistema de incubación contenía: enzima (0,2 ml), PBG en concentraciones variables (1,3 a 1.450 μM) y buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,2-8,3 hasta alcanzar un volumen final de 1 ml. El resto de la metodología fue la usual. (○) Producto formado, (●) sustrato consumido.

Teniendo presente además, que:

- a) extractos de glóbulos rojos humanos calentados y cromatografiados sobre DEAE-celulosa presentan un solo pico con actividad de deaminasa (Smythe y Williams, 1988), posiblemente correspondiente a la enzima nativa;
- b) que fracciones no sometidas a este calentamiento muestran

5 bandas activas, correspondientes a la enzima libre, E-mono pirrol, E-dipirrol, E-tripirrol y E-tetrapirrol (Anderson y Desnick, 1980);

- c) que el calentamiento de extractos crudos conteniendo deaminasa de eritrocitos es el único procedimiento conocido que asegura la total eliminación de la cosintetasa, la que aunque no manifieste su actividad podría permanecer unida a la deaminasa (Smythe y Williams, 1988);

y analizando los resultados obtenidos a partir de nuestros estudios cinéticos, nosotros sugerimos que cuando la isomerasa está asociada a la deaminasa, induciría sobre ella un cambio conformacional que ocasionaría un incremento significativo en las fuerzas que mantienen unido el PBG al sitio activo. Es por este motivo que en el complejo PBG-asa de eritrocitos humanos no se manifiestan efectos homotrópicos en cuanto a la unión de las distintas moléculas de sustrato. Asimismo, el hecho de que la interacción enzima-sustrato sea fuerte justificaría también la existencia de los diferentes complejos enzima-sustrato detectados en fracciones no calentadas, aún después de un tratamiento de lisis osmótica y pasaje por DEAE-celulosa.

Por otra parte, cuando por calentamiento se separa la isomerasa de la deaminasa, se ponen de manifiesto los efectos homotrópicos positivos como una expresión del mecanismo por el cual la deaminasa modifica e incrementa la fuerza de unión de las distintas moléculas de PBG a su/s sitio/s activo/s. Este hecho también avalaría la existencia de una única forma enzimática en las fracciones calentadas, pues los intermediarios no pueden permanecer unidos a la enzima después del proceso de lisis y cromatografía.

Por otro lado, Anderson y col. (1981) en base a las diferencias observadas en los perfiles de elución en DEAE-celulosa y estudios inmunológicos con sangre de individuos normales y porfíricos, trataron de caracterizar la deficiencia genética presente en la deaminasa de dichos pacientes.

En base a sus hallazgos, postularon que si la enzima monomérica normal posee dos sitios de unión para el PBG y un sitio activo (Russell y Rockwell, 1980), la proteína resultante de diferentes mutaciones en el gen estructural, podría tener uno u otro sitio de unión y/o el sitio catalítico defectuoso, o bien presentar

una modificación en la afinidad de la enzima por su sustrato (mayor K_m) o en la velocidad de liberación del HMB.

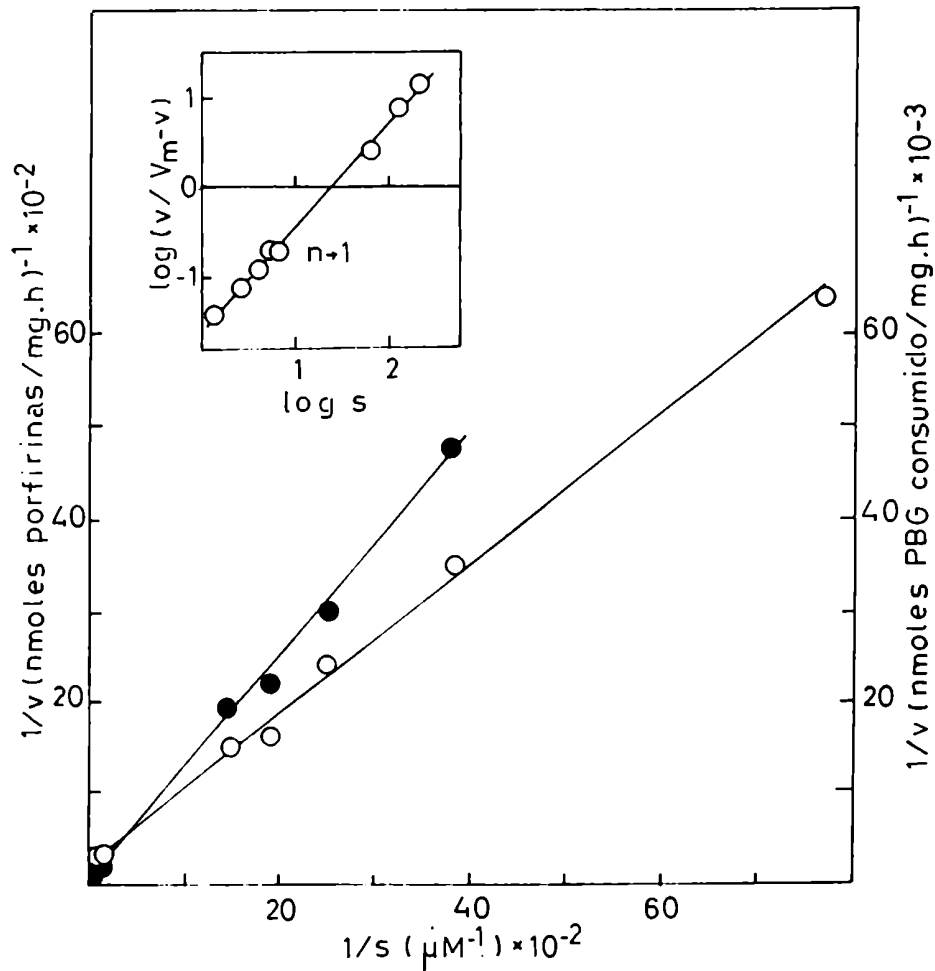


FIGURA 11.8.: Representación de las inversas para la PBG-asa. Los detalles experimentales son los indicados en la leyenda de la Figura 11.7. Es necesario señalar que la V_{max} aparente que se utilizó en la estimación del n de Hill (inset) se determinó por extrapolación en el gráfico de las inversas.

Así, aunque los estudios llevados a cabo con deaminasa y PBG-asa purificadas de diferentes fuentes muestran comportamientos cinéticos muy variados, nosotros apoyamos la hipótesis de que la deaminasa de glóbulos rojos humanos contiene por lo menos dos sitios para la unión del PBG. Además, es probable que la

interacción entre ellos, positiva o negativa, débil o fuerte, varíe con la fuente, así como también la desviación del comportamiento michaeliano puede o no detectarse, dependiendo de las condiciones experimentales y de los métodos de análisis utilizados.

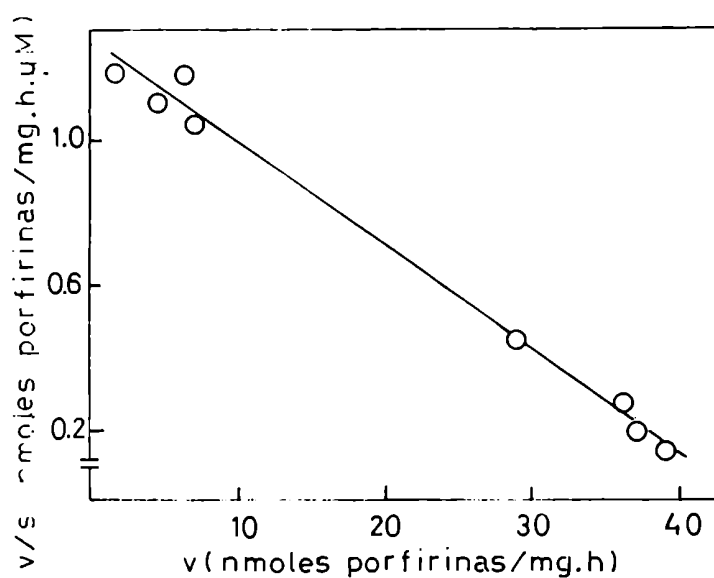


FIGURA II.9.: Representación de Eadie para la PBG-asa. Las condiciones experimentales son las detalladas en la leyenda de la Figura II.7.

Otra diferencia importante en el comportamiento cinético de la deaminasa y la PBG-asa, es la aparición de una inhibición a altas concentraciones de sustrato para la primer enzima, que se adjudicó en principio a una típica inhibición por sustrato. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que el HMB contribuya en cierto grado a dicha inhibición, tal como sucede con la deaminasa de *L. gracilis* (Battersby y col., 1983). De ser válida esta hipótesis, es lógico suponer que en el complejo PBG-asa, la isomerasa al remover el HMB para transformarlo en Urogen III anula dicho efecto inhibitorio.

II.2.3. Estequiometría de la reacción

Al analizar la estequiometría de la reacción catalizada

por la PBG-asa de callos de soya (Llambías y Batlle, 1971 b), *Euglena gracilis* (Rossetti, 1978) y *Rp. palustris* (Juknat, 1983) y por la deaminasa de esta última fuente (Kotler y col., 1987 b), se encontró que la formación real de Urogen es extremadamente menor que la teórica calculada en base al consumo de sustrato, lo cual indica una gran desviación de los valores estequiométricos.

En la Figura II.10. se muestra la estequiometría correspondiente a la deaminasa y PBG-asa de eritrocitos humanos. En el caso de la deaminasa se observa una relación cercana a 1 a la menor concentración de PBG ensayada ($2,6 \mu\text{M}$), luego se duplica en el rango de $6,6$ a $26,5 \mu\text{M}$ y finalmente, aumenta hasta llegar a 27 veces para $1.593 \mu\text{M}$.

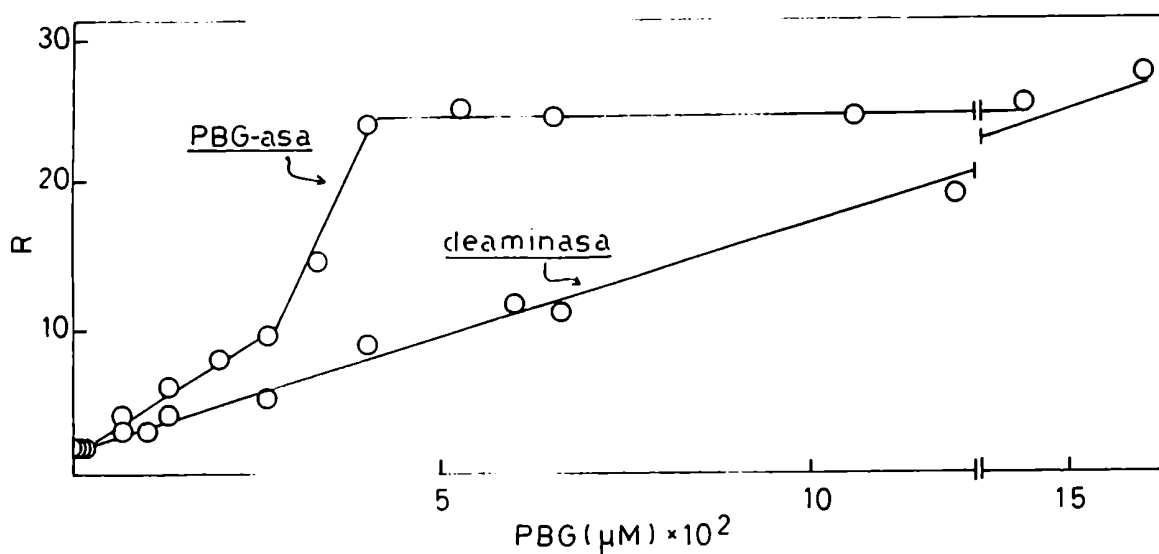


FIGURA II.10.: Estequiometría de la reacción. Se empleó deaminasa y PBG-asa purificadas 180 y 215 veces, respectivamente. La relación R se obtuvo de la división de los nmoles de porfirinas teóricas (calculados en base al PBG consumido) y los nmoles de producto realmente formado. Los sistemas de incubación empleados fueron los usuales, salvo por el agregado de cantidades variables de sustrato. El resto de la metodología empleada fue la habitual.

Al igual que la deaminasa de hígado de cerdo, esta enzima parece ser inhibida por HMB, si bien en esta oportunidad no se alcanza un plateau a las concentraciones en que el consumo de

sustrato es constante ($> 600 \mu\text{M}$). Este último hecho podría deberse a que el PBG inhibe a niveles superiores a $400 \mu\text{M}$, lo que ocasionaría un incremento en la relación estequiométrica.

Por otra parte, la PBG-asa al igual que la deaminasa cumple la estequiometría hasta $2,6 \mu\text{M}$ de PBG, luego la relación es cercana a 2 ($2,6 \mu\text{M} < (\text{PBG}) < 6,6 \mu\text{M}$) y posteriormente se incrementa hasta 23 veces para niveles de PBG entre $6,6 \mu\text{M}$ y $400 \mu\text{M}$. El aumento posterior en la concentración de sustrato no afecta la relación alcanzada pues a partir de $400 \mu\text{M}$ la formación de porfirinas y el consumo de PBG es constante.

Sin embargo, señalaremos que en la zona en que se observa el mayor incremento de la relación estequiométrica ($6,6 \mu\text{M} < (\text{PBG}) < 400 \mu\text{M}$) podría existir una inhibición por producto sobre el complejo PBG-asa. Asimismo, la variación de la pendiente ($265 \mu\text{M} < (\text{PBG}) < 400 \mu\text{M}$) podría adjudicarse no sólo al efecto inhibitorio del Urogen III sino a que en esa región la formación de porfirinas es constante mientras que el consumo de PBG no alcanzó aún la saturación.

CAPITULO III

OTRAS PROPIEDADES QUE CARACTERIZAN A LA DEAMINASA DE GLOBULOS ROJOS HUMANOS

	Página
III.1. Efecto de los iones amonio y de la hidroxilamina	207
III.1.1. Cinética en presencia de iones amonio	210
III.2. Efecto de cationes	211
II.2.1. Efecto de los cationes monovalentes sodio y potasio	213
II.2.2. Efecto del calcio y el magnesio	213
II.2.3. Efecto de otros cationes	214
III.3. Cinética en presencia de cationes mono y divalentes	215
III.4. Estructura cuaternaria de la deaminasa. Equilibrio de asociación - disociación	217
III.4.1. Efecto de la urea sobre la deaminasa soluble de eritrocitos humanos	219
III.4.2. Efecto de la urea sobre la deaminasa insolubilizada de eritrocitos humanos	221
III.4.3. Disociación -reasociación de la deaminasa insolubilizada	223

III. OTRAS PROPIEDADES QUE CARACTERIZAN A LA DEAMINASA DE GLOBULOS ROJOS HUMANOS

III.1. EFEECTO DE LOS IONES AMONIO Y DE LA HIDROXILAMINA

Bogorad (1962 a, b; 1963) observó por primera vez que la deaminasa era inhibida por ciertas concentraciones de iones amonio y de hidroxilamina afectando el consumo de PBG en menor grado que la formación de porfirinas. Este mismo efecto se repitió con deaminasas de diversas fuentes (Sancovich y col., 1969 a, b; Llambías y Batlle, 1971 a, b.; Frydman y Feinstein, 1974; Rossetti, 1978; Kotler y col., 1987 b). La Figura III.1.A muestra los resultados obtenidos al investigar el efecto de los iones amonio sobre la deaminasa de eritrocitos. En ella se observa nuevamente que este catión inhibe más la formación de producto que el consumo de sustrato. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que esta base nitrogenada podría actuar sobre la ciclización del tetrapirrol, causando así una importante disminución en la cantidad de porfirinas formadas pero no en el consumo de PBG (Llambías y Batlle, 1970 a, b; 1971 a, b; Batlle y Rossetti, 1977). Asimismo, Pluscec y Bogorad (1970), Radmer y Bogorad (1972) y Davies y Neuberger (1973) encontraron que cuando las deaminasas de *Rp. spheroides* y hojas de espinaca catalizan la reacción en presencia de iones amonio, hidroxilamina o metoxiamina, no se altera la velocidad de condensación de las moléculas de PBG, mientras que la velocidad de ciclización del tetrapirrol lineal decrece significativamente, acumulándose de este modo intermediarios no isomerizados lineales.

Diez años después, Battersby y col. (1982) sugirieron un mecanismo de acción para la deaminasa, en el cual la enzima formaría un intermediario azafulveno que sería liberado al medio. Este compuesto se transformaría rápidamente, por reacción con el agua, en el HMB, el cual se cicla para dar Urogen I. Sin embargo, el agregado de pequeños nucleófilos, tales como estas bases nitrogenadas, causaría una competencia con el agua por el azafulveno, produciendo bilanos moderadamente estables, los que se acumularían en el medio. Esta hipótesis está en total acuerdo con el efecto del amonio sobre la deaminasa de eritrocitos humanos. No obstante, al analizar la acción de la hidroxilamina sobre esta

enzima (Figura III.1.B) se encontró que este compuesto inhibe totalmente tanto la formación de porfirinas como el consumo de PBG. De acuerdo a esto, parecería ser que el efecto de algunas bases nitrogenadas sobre la enzima de glóbulos rojos humanos es diferente del encontrado para deaminasas de otras fuentes.

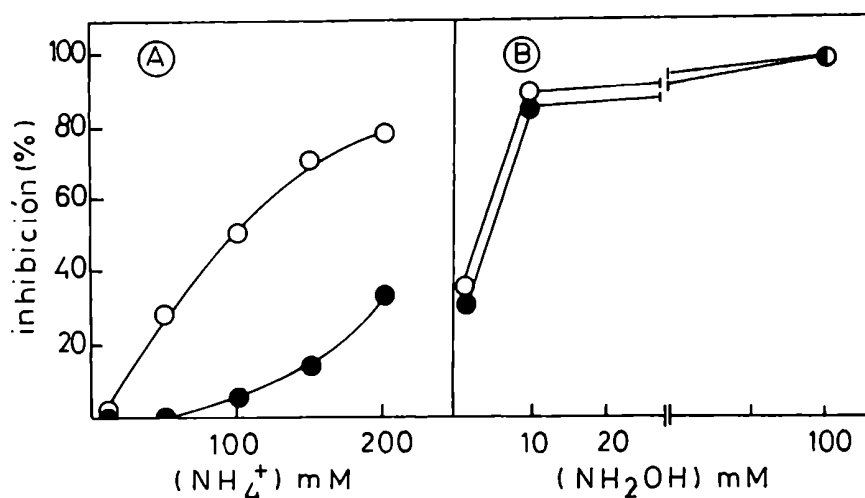


FIGURA III.1.: Efecto del amonio y de la hidroxilamina.

Se empleó deaminasa purificada 180 veces (7,45 mg/ml). El sistema de incubación contenía: preparación enzimática (0,2 ml), PBG (265,5 nmoles), cantidades crecientes de nitrato de amonio (A) o hidroxilamina (B), según se indica, y buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 hasta alcanzar un volumen final de 1 ml. Se realizó una preincubación de 10 minutos sin el sustrato, al cabo de la cual se agregó el PBG y se incubó 1 hora a 37 °C en oscuridad y aerobiosis. El resto de la metodología fue la usual. El porcentaje de inhibición se expresó sobre la base de las uroporfirinas formadas (○) o el PBG consumido (●), considerando el control como 100 % de actividad y 0 % de inhibición.

Con el objeto de esclarecer este punto, se realizó una experiencia en la cual se estudió el efecto de la preincubación en presencia de los inhibidores, los que se agregaron en concentraciones menores a fin de dilucidar su verdadera acción sobre

la deaminasa (Figura III.2.).

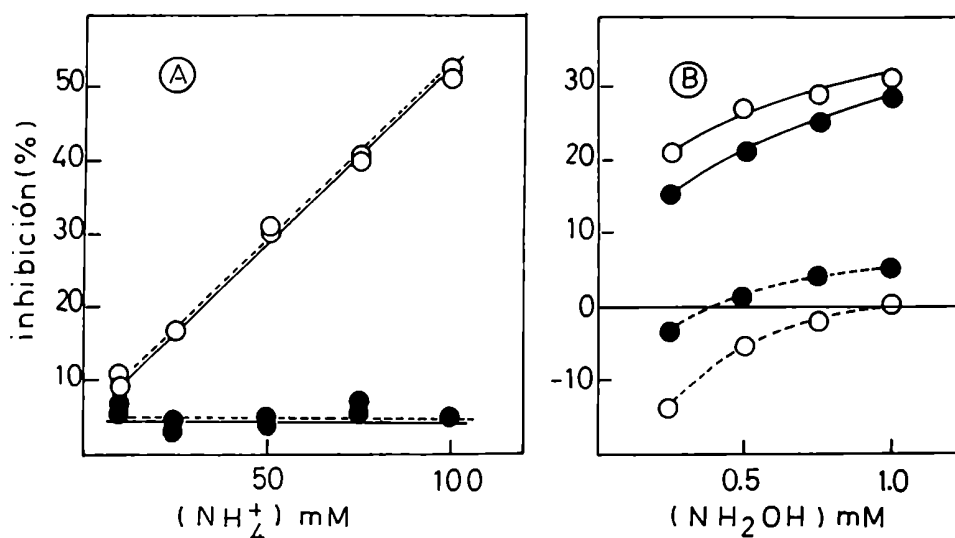


FIGURA III.2.: Efecto del amonio y la hidroxilamina. Se siguió la metodología descrita en la levenda de la Figura III.1., preincubandò (—) o no (---) en ausencia de sustrato. Nuevamente, el porcentaje de inhibición se expresó en base a las porfirinas formadas (\circ) y el PBG consumido (\bullet).

Analizando comparativamente el efecto del amonio sobre la enzima preincubada o no en ausencia de sustrato (Figura III.2.A), se observa una acción similar en ambos casos, ya que hasta una concentración de 100 mM de iones amonio casi no se detecta inhibición sobre el consumo de PBG, en tanto que a la mayor concentración de inhibidor ensayada se alcanza un 50 % de inhibición sobre la formación de porfirinas. Este hecho apoya nuevamente la hipótesis de que el amonio compite con el agua por el azafulveno, inhibiendo de este modo la formación del Urogen I pero no el consumo de sustrato.

Sin embargo al investigar la acción de la hidroxilamina sobre la deaminasa preincubada o no en ausencia de sustrato (Figura III.2.B), se ponen en evidencia varios hechos interesantes. En primer lugar, reiteramos que este compuesto afecta en igual grado el consumo de PBG y la formación de porfirinas en ambas condiciones. En segundo término, se observa que la inhibición se manifiesta cuando la enzima es preincubada en ausencia de PBG.

Este hecho podría indicar que esta base nitrogenada puede actuar no solamente a nivel de la formación de porfirinas, como el amonio, sino también afectando la unión del sustrato a su sitio ya sea uniéndose directamente a él o modificando de alguna forma su afinidad por el PBG. Finalmente señalaremos que cuando la deaminasa no se preincubó con el inhibidor, la hidroxilamina en bajas concentraciones, parecería tener un efecto activante, lo que avalaría la hipótesis de que este compuesto modificaría la unión del PBG a su sitio activo, posiblemente provocando un cambio conformacional en la enzima.

III.1.1. Cinética en presencia de iones amonio

En base a los resultados de otros autores y los obtenidos en el presente trabajo con los iones amonio, resultó de interés investigar la cinética de la reacción en presencia de estos iones.

El gráfico de Michaelis-Menten para la deaminasa de eritrocitos humanos en presencia de iones amonio se encuentra representado en la Figura III.3. En él se observa una curva hiperbólica en ausencia y presencia de estos cationes. En la Figura III.4, se representan las inversas, a partir de las cuales se determinaron los parámetros cinéticos para cada concentración ensayada (Figura III.4., inset). Del análisis de estos valores surge que los iones amonio modifican la V_{max} y el K_m de la enzima, disminuyendo la primera y aumentando el segundo, a todas las concentraciones estudiadas, sin alterar el n de Hill. Asimismo, es necesario destacar que en todos los casos se observa la inhibición a altos niveles de sustrato.

Se debe hacer notar además, que en esta oportunidad sólo se detecta una ligera desviación de la linealidad pues, como ya señalamos ésta se pone de manifiesto sólo para concentraciones de PBG menores que $7 \mu M$.

Además, dado que estamos a concentraciones de amonio menores que $100 mM$, no se observó inhibición en el consumo de sustrato y es por ello que no se presentan los gráficos correspondientes.

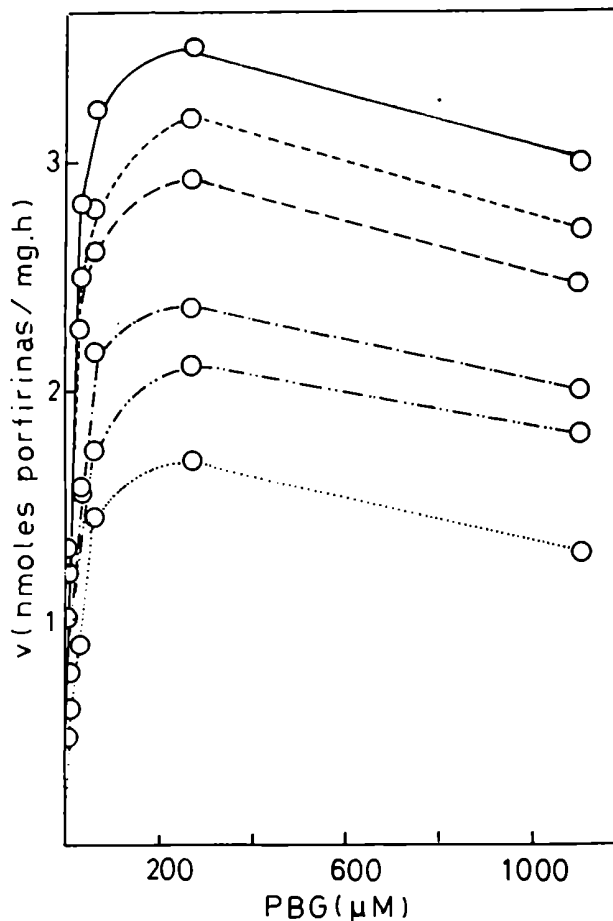


FIGURA III.3.: Gráfico de Michaelis-Menten en presencia de iones amonio. Se empleó deaminasa purificada 180 veces (2,10 mg/ml). El sistema de incubación contenía: preparación enzimática (0,2 ml), cantidades variables de PBG (10 a 1.100 μ M), nitrato de amonio en diferentes concentraciones y el buffer usual hasta 1 ml de volumen final. (amonio): 0 mM (—), 10 mM (---), 25 mM (— —), 50 mM (- - -), 75 mM (- - -) y 100 mM (· · · · ·).

III.2. EFECTO DE CATIONES

Recordemos que la presencia de ciertas concentraciones de iones sodio y magnesio producían una activación de las

deaminasas de hígado bovino (Sancovich y col., 1969 a) y callos de soya (Llambías y Batlle, 1971 b). No obstante, al investigar el efecto de una mezcla de cloruro de sodio y cloruro de magnesio sobre la deaminasa de eritrocitos humanos (Tabla II.1.) no se observó estimulación de la actividad sino por el contrario una ligera inhibición. Es así que nos pareció interesante analizar el efecto de éstos y otros cationes sobre nuestra enzima de glóbulos rojos.

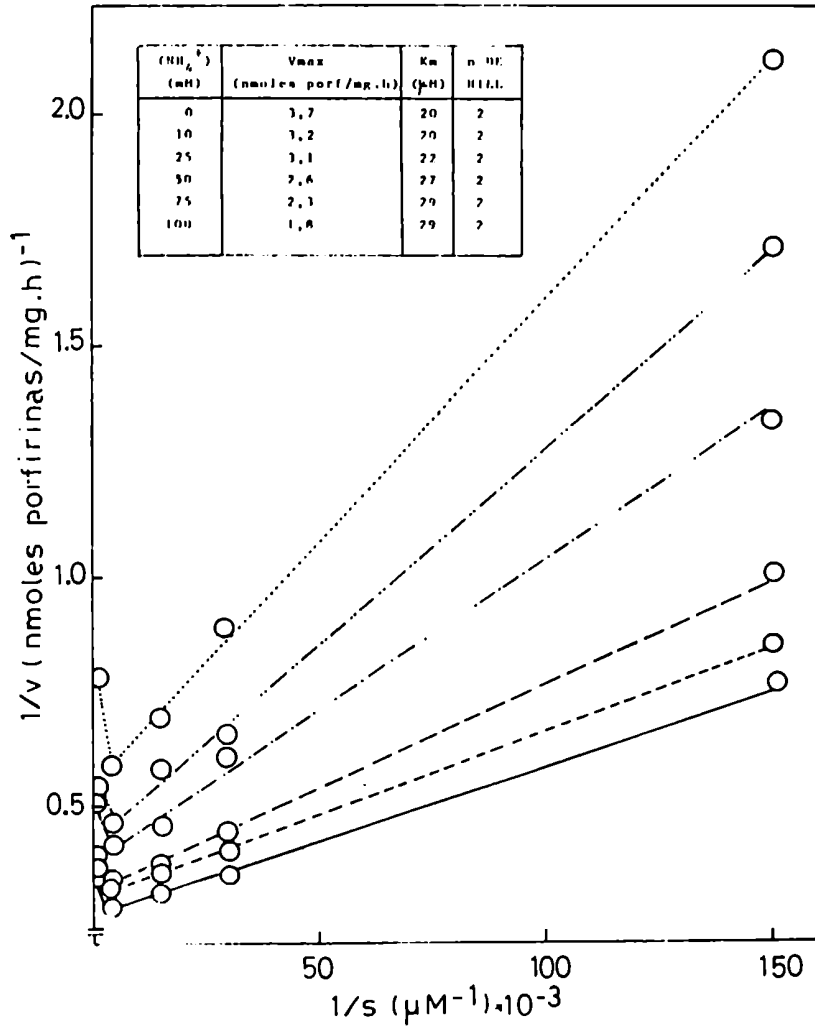


FIGURA III.4.: Representación de Lineweaver-Burk en presencia de iones amonio. Los detalles experimentales se indican en la leyenda de la Figura III.3.

III.2.1. Efecto de los cationes monovalentes sodio y potasio

Llambías y Batlle (1971 b) y Sancovich y col. (1976) reportaron que las deaminasas de callos de soya e hígado vacuno, respectivamente se activaban en presencia de iones sodio y potasio a concentraciones entre 1 y 100 mM. Por otra parte, la deaminasa de eritrocitos de ave y gérmen de trigo no se inhibe o lo hace muy poco, a niveles entre 50 y 200 mM de estos cationes (Frydman y Frydman, 1970; Llambías y Batlle, 1971 a).

En la Figura III.5. se presentan los resultados obtenidos al analizar el efecto de los iones sodio (A) y potasio (B) sobre la actividad de la enzima eritrocítica. En ella se observa que ambos cationes alteran en mayor grado la formación de producto que el consumo de PBG. Además, tanto el sodio como el potasio son inhibidores muy débiles, pues a una concentración tan elevada como 200 mM sólo disminuyen alrededor de un 20 % la actividad de la deaminasa. La diferencia existente entre ambos cationes es que el sodio comienza a inhibir recién a concentraciones mayores que 50 mM mientras que el potasio a una concentración tan pequeña como 1,5 mM ya inhibía un 10 %, valor que se mantiene aproximadamente constante hasta 50 mM y a partir de allí comienza a aumentar levemente su efecto inhibitorio hasta un 20 % para la máxima concentración ensayada.

III.2.2. Efecto del calcio y el magnesio

La acción de los cationes divalentes calcio y magnesio sobre la deaminasa de eritrocitos humanos se representa en la Figura III.6. Al igual que los iones sodio y potasio, estos cationes inhiben más la formación de uroporfirinógenos que el consumo de PBG. Sin embargo, son inhibidores más poderosos que los iones monovalentes, pues a una concentración de 200 mM no se detecta formación de producto y se consume tan sólo un 30 - 45 % de sustrato.

Recordando el posible efecto inhibitorio de la mezcla cloruro de sodio - cloruro de magnesio sobre esta enzima (Tabla II.1.) y a fin de efectuar un análisis comparativo con los datos presentados en las Figuras III.5.A y III.6.B, se calculó la concentración resultante de iones sodio y magnesio en el medio de incubación después del agregado de la mezcla, los cuales son de tan sólo 2 mM y 6×10^{-3} mM, para el sodio y el magnesio,

respectivamente. Estos niveles se encuentran dentro del rango en que ambos cationes no alteran la actividad enzimática, descartándose entonces el probable efecto causado por los mismos.

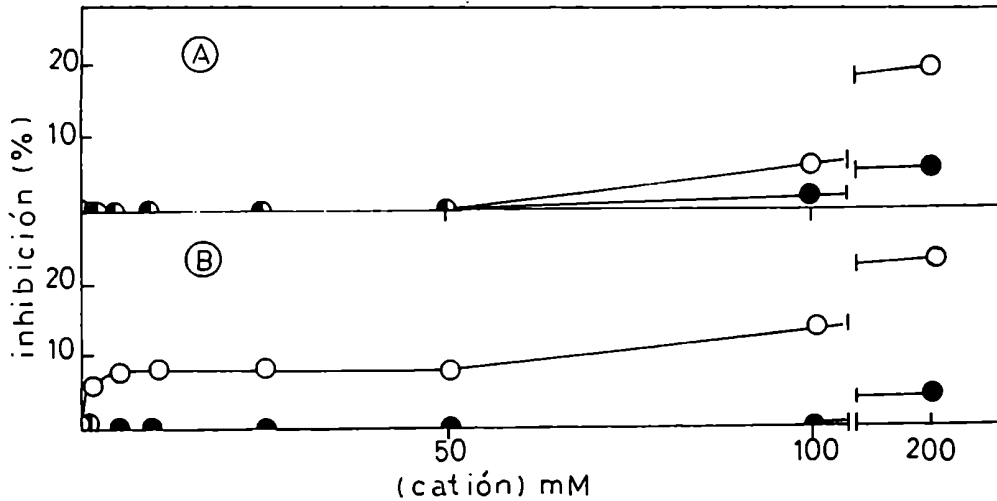


FIGURA III.5.: Efecto de los cationes monovalentes sodio y potasio.

Se empleó deaminasa purificada 180 veces. El sistema de incubación fue el usual salvo por el agregado de cloruro de sodio (A) y cloruro de potasio (B), según se indica. El porcentaje de inhibición fue calculado tomando como 0 % de inhibición el control sin agregado de catión y se determinó en base a las porfirinas formadas (O) y al PBG consumido (●).

III.2.3. Efecto de otros cationes

Se investigó además, la acción de varios cationes sobre la deaminasa de glóbulos rojos humanos (Tabla III.1.), observándose, en todos los casos, una inhibición más marcada sobre la formación de uroporfirinas que sobre el consumo de PBG. Todos los cationes estudiados: zinc, cadmio, cobre (II), hierro (II y III) inhibieron fuertemente la deaminasa a concentraciones de 1 mM, probablemente debido a su unión con algunos grupos tioles esenciales de la enzima. Estos resultados están en total acuerdo con lo anteriormente reportado por Llambías y Batlle (1971 a, b) y Sancovich y col. (1976).

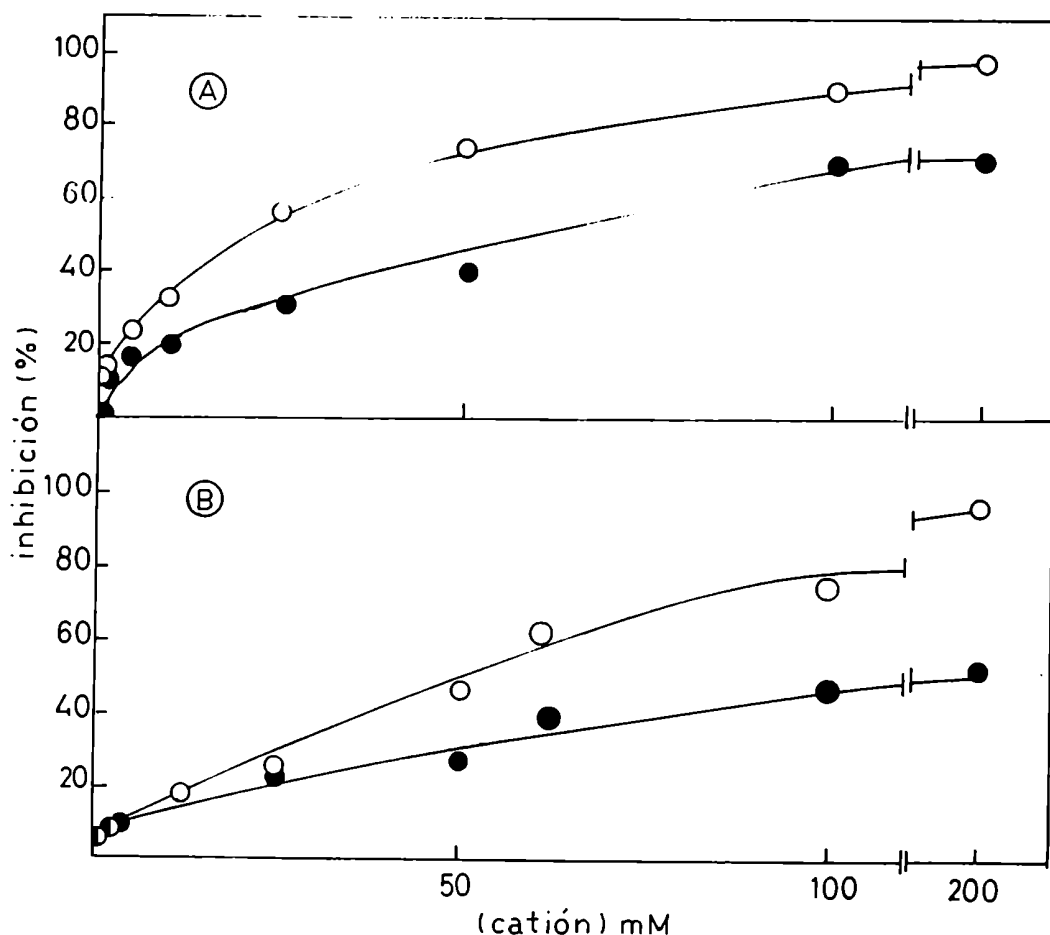


FIGURA III.6.: Efecto del calcio y el magnesio. El sistema de incubación fue el usual salvo por el agregado de cloruro de calcio (A) y cloruro de magnesio (B), según se indica. Otros detalles experimentales son los indicados en la leyenda de la Figura III.5.

III.3. CINÉTICA EN PRESENCIA DE CATIONES MONO Y DIVALENTES

Juknat (1983) estudiando el efecto de los iones magnesio sobre la actividad de la PBG-asa de *Rp. palustris* halló que este catión estimulaba o no a la enzima dependiendo de los niveles de PBG presentes en el medio de incubación. Más tarde, Kotler y col. (1987 b), trabajando con deaminasa de la misma fuente, encontró que el magnesio posee dos efectos diferentes: actúa como un activador a bajas concentraciones de PBG y como un inhibidor no competitivo a altos niveles de sustrato, sin alterar el perfil cinético en ninguno de los dos casos.

TABLA III.1.: Efecto de otros cationes

CATION AGREGADO		INHIBICION (%)	
Tipo	Concentración (mM)	Porfirinas formadas	PBG consumido
Zn ²⁺	0,01	14	0
	0,10	71	5
	0,50	100	55
	1,00	100	70
Cd ²⁺	0,02	22	0
	0,20	90	10
	1,00	100	25
	10,00	100	35
Cu ²⁺	1,00	100	70
	10,00	100	75
	50,00	100	78
Fe ²⁺	1,00	98	18
	10,00	100	22
	50,00	100	40
Fe ³⁺	1,00	98	60
	10,00	100	60
	50,00	100	60

Se empleó deaminasa purificada 180 veces. El sistema de incubación fue el usual, salvo por el agregado de cloruro de zinc, cloruro de cadmio, sulfato de cobre, sulfato ferroso y cloruro férrico en las concentraciones indicadas. Los porcentajes de inhibición se calcularon en base a las porfirinas formadas o el sustrato consumido, tomando el control como 0 % de inhibición, 100 % de actividad.

Sobre la base de estos antecedentes, se decidió investigar si la cinética de la deaminasa de eritrocitos humanos se modificaba por la presencia de los cationes monovalentes sodio y potasio (Tabla III.2.) o de los divalentes calcio y magnesio (Tabla III.3.). Analizando los resultados surge que ninguno de estos cationes metálicos altera la velocidad de formación de porfirinas o consumo de sustrato, a todas las concentraciones de PBG ensayadas, así como tampoco modifica los parámetros cinéticos de la enzima.

Tabla III.2.: Cinética en presencia de iones monovalentes

CATION		Vmax (nmoles porf/mg.h)	Km (μ M)
Tipo	Concentración (mM)		
Na ⁺	0	3,1	23
	0,5	3,1	23
	1,0	3,1	23
	1,5	3,1	23
K ⁺	0	3,1	23
	0,5	3,1	23
	1,0	3,1	23
	1,5	3,1	23

Se empleó deaminasa purificada 180 veces. Los iones sodio y potasio se agregaron como cloruros al medio de incubación. El resto de la metodología fue la usual.

III.4. ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LA DEAMINASA. EQUILIBRIO DE ASOCIACION -- DISOCIACION

Existe una gran variedad de compuestos que afectan el equilibrio de asociación - disociación de las proteínas. Entre ellos, los que aparentemente son más efectivos para producir una disociación transitoria en subunidades son: urea, sales de guanidina y ciertos detergentes.

Burk y Greemberg (1930) emplearon la urea con el fin de desarrollar un método para la determinación de pesos moleculares de proteínas insolubles en el punto isoeléctrico. El trabajo de estos autores permitió confirmar observaciones, entonces recientes, de que la hemoglobina y otras proteínas se disociaban en unidades de PM's menores. Estos hallazgos estaban demostrando "el desdoblamiento de la molécula proteica durante la desnaturalización. En un principio se pensó que la urea desnaturalizaba la proteína

y que este proceso era seguido por desdoblamiento. Sin embargo, en 1938 Steinhardt observó que la pepsina retenía actividad en urea 4 M, lo cual llevó a modificar los conceptos anteriores sobre el fenómeno. Numerosas evidencias obtenidas posteriormente señalaron la posible reversibilidad de la desnaturalización como así también la de la disociación.

TABLA III.3.: Cinética en presencia de iones divalentes

CATION		Vmax (nmoles por f/mg.h)	Km (μ M)
Tipo	Concentración (mM)		
Ca ²⁺	0	3,4	23
	0,5	3,4	23
	1,0	3,4	23
	1,5	3,4	23
Mg ²⁺	0	3,4	21
	0,5	3,4	21
	1,0	3,4	21
	1,5	3,4	21

Se empleó deaminasa purificada 180 veces. Los iones calcio y magnesio se agregaron como cloruros al medio de incubación. El resto de la metodología fue la usual.

En cuanto a la acción de la urea, se sugirió que este compuesto puede cambiar los valores de pK de los grupos disociables (Burk y Greenberg, 1930) y formas múltiples de resonancia (Greenstein, 1938). Se ha propuesto también la formación de uniones hidrógeno intermoleculares entre la urea y las uniones peptídicas expuestas (Simpson y Kauzman, 1953). Un estudio de la estabilidad de las uniones hidrógeno interpeptídicas en solución acuosa (Schellman, 1955) condujo a pensar que las regiones random de la proteína se ven estabilizadas por la unión de la urea a sitios

requeridos para la unión hidrógeno en la hélice; no obstante, existen numerosas evidencias en contra de esta hipótesis (Mc Kenzie y col., 1955; Echols y Anderégg, 1960; Klotz y Franzen, 1960; Levy y Magoulas, 1961, 1962). Bruning y Holtzer (1961) y Whitney y Tanford (1962) intentaron demostrar la acción de la urea sobre uniones hidrofóbicas utilizando compuestos modelo.

De todos modos e independientemente del efecto primario de la urea sobre las proteínas, el empleo de este compuesto como agente disociante proteico es sumamente útil. Por ejemplo, se demostró (Boeri y Ripa, 1961) que la urea puede disociar el complejo enzima-flavocitocromo b_2 en una hemoproteína, una flavina y un polinucleótido.

La acción de la urea sobre las enzimas varía ampliamente. Algunas enzimas tales como la papaína y la carboxipeptidasa son activas en urea 8 M, mientras que otras como la quimotripsina parecen ser inactivadas irreversiblemente por esa concentración de agente disociante y finalmente otras, como la ribonucleasa (Nelson y Hummel, 1962) y la tripsina (Cole y Kincade, 1961) se inactivan reversiblemente.

II.4.1. Efecto de la urea sobre la deaminasa soluble de eritrocitos humanos

Dado que la deaminasa de eritrocitos presenta a muy bajas concentraciones de sustrato un comportamiento cinético característico de una enzima alostérica, es decir propio de una proteína oligomérica, nos pareció sumamente interesante investigar el efecto de la urea sobre esta enzima. Para ello, se estudió la acción de concentraciones variables de este compuesto (0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5 y 6 M) sobre la actividad de la deaminasa (Figura III.7.). Se observó que cantidades crecientes de urea inhiben progresivamente la enzima, alcanzándose un 50 % de inactivación con 3 M del compuesto y un 100 % a la mayor concentración en sayada (6 M).

Posteriormente, y con el objeto de estudiar la posible reversión de este efecto, se preincubó la deaminasa en presencia de cantidades variables de urea durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se dializó contra buffer Tris-HCl 5 mM pH 7,3 - 7,4 durante 26 horas. Una vez eliminada la urea del medio, se incubó la fracción enzimática resultante siguiendo la

metodología usual. Los resultados obtenidos se representan en la Figura III.8. Analizando la misma se observa una reversión de hasta un 65 % para una concentración de urea 4 M, mientras que a niveles superiores del agente disociante el porcentaje de reversión disminuye.

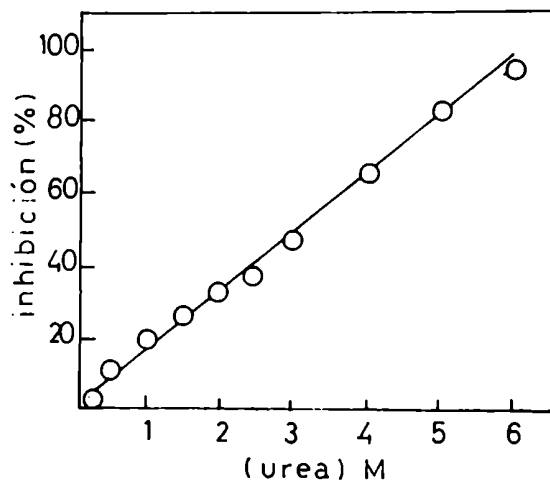


FIGURA III.7.: Efecto de la urea sobre la deaminasa soluble.
Se empleó deaminasa purificada 180 veces. El sistema de incubación contenía: preparación enzimática (0,2 ml), PBC (60 µg = 265, 5 unidades), urea 5 0 u M en un volumen adecuado para alcanzar la molaridad deseada. Todos los componentes se encontraban disueltos en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 el cual fue empleado para alcanzar un volumen final de 1 ml. El porcentaje de inhibición se calculó según la actividad enzimática basada en las portirinas formadas de la siguiente manera:
$$\%I(\text{urea}) = \frac{A(E) - A(E\text{urea})}{A(E)} \times 100$$

donde $A(E)$ = actividad enzimática

De acuerdo a los resultados expuestos hasta este momento, se puede concluir que la deaminasa de eritrocitos humanos se desnaturaliza progresivamente con cantidades crecientes de urea, si bien es necesario destacar que es bastante estable, pues sólo pierde el 100 % de su actividad a concentraciones tan altas como 6 M de este compuesto. Asimismo, las experiencias de reversión indican que la enzima desnaturalizada hasta 4 M de urea es capaz de recuperar su estructura nativa y retener el 100 % de su actividad una vez eliminado el agente disociante. Sin embargo, la deaminasa desnaturalizada a concentraciones superiores a 4 M se reconstituye parcialmente recuperando un 80 % y un 40 % de la actividad del control a concentraciones de 5 y 6 M respectivamente.

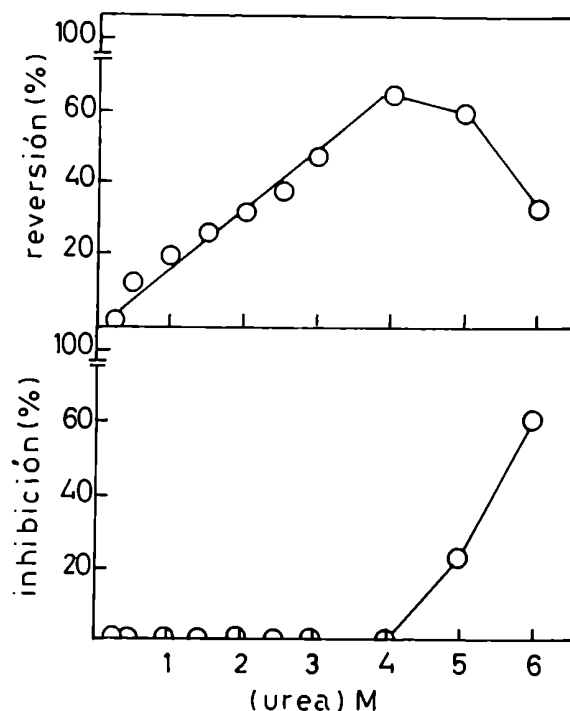


FIGURA III.8.: Reversión de la inhibición por urea. Se empleó deaminasa purificada 180 veces. La metodología se describe en el texto. El % de inhibición se calculó según se detalla en la leyenda de la Figura III.7. y el % de reversión según: % Reversión = $\%I(E+urea) - \%I(E \text{ dializada sin urea})$.

III.4.2. Efecto de la urea sobre la deaminasa insolubilizada de eritrocitos humanos

Cuando se estudia la estructura mínima catalíticamente activa de una enzima oligomérica, resulta de interés conocer si las subunidades individuales de esta proteína son activas o si es necesaria su asociación para la expresión de la actividad enzimática. Uno de los métodos utilizados para tal fin consiste en unir la enzima a una matriz a través de una o dos subunidades y luego eliminar las subunidades no unidas covalentemente por acción

TABLA III.4.: Disociación-reasociación de deaminasa insolubilizada

FRACCION	ACTIVIDAD (nmoles porf)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmoles/mg)	PROTEINAS (mg/ml gel) ó (mg/ml sn)
Gel-enzima	1,6	1,3	6,4
Eluído sin dializar	0,0	0,0	0,2
Eluído dializado	0,0	0,0	0,2
Gel-enzima pretrata <u>do</u> con urea	1,6	1,3	6,0
Gel-enzima reasocia <u>do</u> sin urea	1,8	1,4	6,5
Eluídos reasociados sin dializar:			
4,0 M	0,8	1,0	4,1
3,0 M	1,0	1,3	4,0
2,0 M	1,3	1,4	4,6
1,0 M	1,7	1,9	4,6
0,7 M	1,8	2,0	4,4
0,3 M	2,1	2,3	4,6
0,0 M	2,4	2,5	4,9
Eluídos reasociados con dializados	2,8	2,8	5,0
Enzima soluble	4,6	2,4	9,7

Se empleó deaminasa soluble purificada 180 veces e inmovilizada y tratada según se detalla en la leyenda de la Figura III.10. El sistema de incubación de las fracciones solubles fue el usual; las incubaciones realizadas con enzimas insolubilizadas contenían: 0,4 ml gel-enzima resuspendido 1:1 en buffer, 60 µg de PBG (265,5 nmoles) y buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 hasta un volumen final de 1,5 ml. Los datos de actividad que corresponden a las fracciones insolubilizadas provienen de una sumatoria de nmoles de porfirinas formadas en el sobrenadante de la incubación más los sobrenadantes pertenecientes a tres lavados sucesivos realizados sobre el gel-enzima con 1,5 ml del buffer de incubación.

de un agente disociante adecuado, tal como la urea. De esta forma, se pueden estudiar las propiedades de las subunidades inmovilizadas aisladas bajo condiciones en las cuales no tenga lugar la reasociación. Asimismo, este método puede utilizarse para investigar la reasociación e hibridización de las subunidades unidas con subunidades solubles. En nuestro laboratorio se aplicó exitosamente esta técnica (Batlle y col., 1978; Fukuda, Stafforini y Batlle, resultados no publicados) para estudiar la estructura cuaternaria del ALA-D.

En la Figura III.9. se muestra el efecto de la urea sobre la deaminasa de eritrocitos humanos unida a un soporte de Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno. Los resultados indican que la deaminasa inmovilizada, al igual que la soluble, se inactiva gradualmente por agregado de concentraciones crecientes del agente disociante. No obstante, la unión a la matriz le da mayor estabilidad a la enzima, pues a niveles de urea en que la deaminasa soluble se inhibió un 30 % (1,5 M), la inmovilizada aún mantiene su actividad original. Asimismo, a concentraciones superiores a 1,5 M el porcentaje de inhibición es siempre menor para la enzima inmovilizada que para la soluble, alcanzando un valor cercano a 90 % con 6 M de este compuesto.

III.4.3. Disociación - reasociación de la deaminasa insolubilizada

Con el objeto de estudiar la estructura cuaternaria de la deaminasa de eritrocitos se realizó una experiencia en la cual se intentó disociar la enzima en subunidades por acción de la urea, para luego intentar reconstituir la estructura original mediante su asociación con subunidades solubles.

Operativamente se trabajó de la siguiente manera (Esquema I): la enzima insolubilizada se preincubó en batch durante 15 minutos, con agitación lenta en presencia de urea 4 M. Se seleccionó esta concentración de agente disociante pues como vimos inhibe alrededor de un 50 % la actividad enzimática. Seguidamente el gel-E tratado con urea se empaquetó en una columna y se separó el eluido, el cual se dializó contra buffer Tris-HCl 10 mM pH 7,4 durante 20 horas. Por otra parte, el gel-enzima tratado con urea se lavó sucesivamente con abundante cantidad de buffer hasta valor negativo de proteínas y urea en el líquido eluido. Posteriormente, se pasó enzima soluble más buffer Tris-HCl 0,05 M

pH 7,4 conteniendo concentraciones decrecientes de urea (4; 3; 2; 1; 0,7; 0,3 y 0 M) por la columna constituida por el gel-E pretratado con urea y lavado. En este caso se empleó una concentración total de deaminasa soluble 10 a 20 veces superior a la cantidad de enzima insolubilizada y además el buffer conteniendo los niveles decrecientes de urea se agregó a la enzima aproximadamente 15 minutos antes de su pasaje a través de la columna.

Los eluidos resultantes del ensayo de reasociación se reunieron y se dializaron contra el mismo buffer en las mismas condiciones detalladas anteriormente.

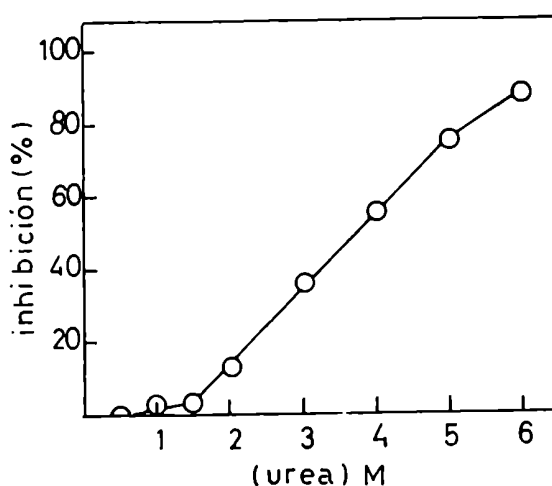
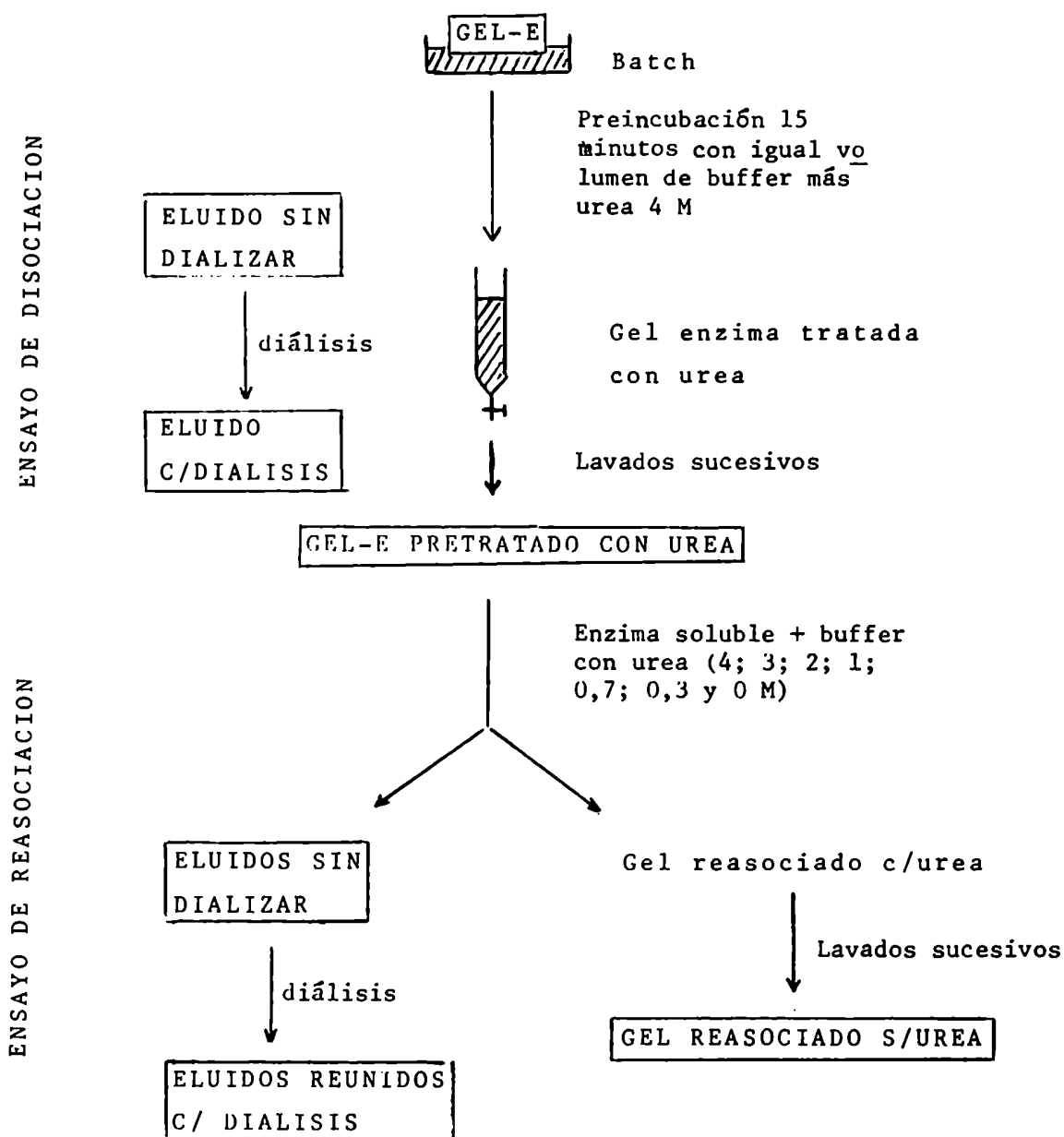


FIGURA III.9.: Efecto de la urea sobre la deaminasa insolubilizada. Se usó deaminasa purificada 180 veces y unida a Sepharosa 4B (15 mg prot/ml gel) previamente activada con BrCN (200 mg/ml gel). La metodología se describe en Materiales y Métodos. El sistema de incubación con tubo: gel-E (0,4 ml resuspendido en buffer, 1:1), PBG (90 g=298 nmoles), urea en concentraciones variables y buffer usual hasta volumen final de 1,5 ml. El % de inhibición se calcula según se indicó en la Figura III.7.

ESQUEMA 1

La Tabla III.4. muestra las actividades enzimáticas de las fracciones indicadas en el Esquema 1; obsérvese que los "eluidos del ensayo de reasociación 4 M, 3 M, 2M, etc" corresponden a los eluidos provenientes del pasaje de enzima soluble más urea de concentración 4 M, 3, M, etc. separadamente, mientras que los indicados como "reasociados dializados" son estos mismos eluidos pero reunidos antes de dializar.

Los resultados experimentales muestran que la enzima in soluble inhibida un 50 % por urea 4 M (Figura III.9.), es capaz de recuperar su estructura nativa, con un 100 % de actividad al eliminar del medio el agente disociante. Por otra parte, el hecho de no detectar actividad enzimática así como tampoco una can ti dad importante de proteínas en los eluídos, dializados o no, está indicando que si bien la enzima se inactiva por acción de la urea, esto no podría atribuirse a una disociación en subunidades independientes; en cambio el monómero desplegado es capaz de replegarse logrando nuevamente su conformación original, al ser removido el agente desnaturalizante.

Como era de esperar, el ensayo de reasociación no dió los resultados anhelados, por cuanto las evidencias señalan que la deaminasa no se disoció en subunidades por acción de la urea; en consecuencia tampoco pudo haber ocurrido reasociación.

Todos estos hallazgos indican que la deaminasa de eritrocitos humanos es una enzima monomérica. No obstante no se puede descartar totalmente la posibilidad de que esté constituida por dos subunidades que no se separan por acción de la urea, así como tampoco se puede desechar la hipótesis de que ambas cadenas polipeptídicas se unan al gel, lo que impediría la liberación de las subunidades disociadas.

Por su parte, Anderson y Desnick (1980) y Smythe y Williams (1988) realizando electroforesis en medio disociante de la deaminasa purificada de eritrocitos humanos, encontraron que la enzima estaba constituida por una sola cadena polipeptídica o monómero.

P A R T E I I I

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Anderson, P. & Desnick, R. (1980) J. Biol. Chem. 255 (5), 1983.
- Anderson, P.; Reddy, R.; Anderson, K. & Desnick, R. (1981) J. Clin. Invest. 68, 1.
- Araujo, L.; Lombardo, M.; Rossetti, M. & Batlle, A. (1987) Rev. Arg. Microbiologia 19, 109.
- Batlle, A. & Rossetti, M. (1977) Int. J. Biochem. 8, 251.
- Batlle, A.; Benson, A. & Rimington, C. (1965) Biochem. J. 97, 731.
- Batlle, A.; Wider, E. & Stella, A. (1978) Int. J. Biochem. 9, 407.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Gustafson Potter, K.; Mc Donald, E. & Matcham, G. (1982) J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 2427.
- Battersby, A.; Fookes, C.; Hart, G.; Matcham, G. & Pandey, P. (1983) J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 3041.
- Boeri, E. & Rippa, M. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 94, 336.
- Bogorad, L. (1958 a) J. Biol. Chem. 233, 501.
- Bogorad, L. (1958 b) J. Biol. Chem. 233, 510.
- Bogorad, L. (1962 a) en "Methods in Enzymology" (Eds. S.F. Colowick y N.O. Kaplan), vol. 5, p.885. Academic Press, N.Y.
- Bogorad, L. (1962 b) en "Physiology and Biochemistry of Algae" (Ed. P.A. Lewis), p. 385. Academic Press, New York.
- Bogorad, L. (1963) Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 676.
- Bradford, M. (1976) Analytical Biochem. 72, 248.
- Bruning, W. & Holtzer, A. (1961) J. Am. Chem. Soc. 83, 4865.
- Bruk, N. & Greenberg, D. (1930) J. Biol. Chem. 87 197.
- Bustos, N.; Stella, A.; Wider de Xifra, E. & Batlle, A. (1980) Int. J. Biochem. 12, 745.
- Clement, R.; Kohashi, M. & Piper, W. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 214 (2), 657.
- Cole, R. & Kincade, J. Jr. (1961) J. Biol. Chem. 236, 2443.
- Cornford, P. (1964) Biochem. J. 911, 64.

- Davies, R. & Neuberger, A. (1973) *Biochem. J.* 133, 471.
- Echols, G. & Anderegg, J. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* 82, 5085.
- Frydman, R. & Feinstein, (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 350, 358.
- Frydman, R. & Frydman, B. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 193.
- Frydman, R.; Tomaro, M.; Wanschelbaum, A. & Frydman, B. (1972) *FEBS lett.* 26, 203.
- Greenstein, J. (1938) *J. Biol. Chem.* 125, 501.
- Hensley, P.; Yang, Y. & Schachman, H. (1981) *J. Mol. Biol.* 152, 131.
- Higuchi, M. & Bogorad, L. (1975) *Ann. Y.Y. Acad. Sci.* 244, 401.
- Jordan, P. & Shemin, D. (1973) *J. Biol. Chem.* 243, 1019.
- Juknat, A. (1983) Tesis Doctoral (UBA).
- Juknat, A.; Rossetti, M. & Batlle, A. (1981) *Int. J. Biochem.* 13 (3), 343.
- Juknat, A.; Kotler, M.; Koopmann, G. & Batlle, A. (1988 a) *Comp. Biochem. Physiol.*, en prensa.
- Juknat, A.; Dornemann, D. & Senger, H. (1988 b) *Z. Naturforsch* 43 C, 351.
- Juknat, A.; Dornemann, D. & Senger, H. (1988 c) *Z. Naturforsch.* 43 C, 357.
- Keilin, D. & Hartree, E. (1951) *Biochem. J.* 49, 88.
- Klotz, I. & Franzen, J. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* 82, 5241.
- Kotler, M. (1988) Tesis Doctoral (UBA).
- Kotler, M.; Fumagalli, S.; Juknat, A. & Batlle, A. (1987 a) *Comp. Biochem. Physiol.* 87 B(3), 601.
- Kotler, M.; Fumagalli, S.; Juknat, A. & Batlle, A. (1987 b) *Int. J. Biochem.* 19 (10), 981.
- Kreutzer, M.; Schmidt, M.; Stadler, E. & Zeitler, H. (1977) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 358, 1081.
- Levy, M. & Magoulas, J. (1961) *Federation Proc.* 20, 381.
- Levy, M. & Magoulas, J. (1962) *Federation Proc.* 21, 405.
- Lockwood, W. & Benson, A. (1960) *Biochem. J.* 75, 372.

- Lowry, O.; Rosebrough, N.; Farr, L. & Randall, R. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Llambías, E. & Batlle, A. (1970 a) *Biochim. Biophys. Acta* 220, 552.
- Llambías, E. & Batlle, A. (1970 b) *FEBS lett.* 9 (3), 180.
- Llambías, E. & Batlle, A. (1971 a) *Biochem. J.* 121, 327.
- Llambías, E. & Batlle, A. (1971 b) *Biochim. Biophys. Acta* 227, 180.
- Llambías, E.; Locascio, G. & Batlle, A. (1971) *Anales Asoc. Quím. Arg.* 59, 271.
- Mc Kenzie, H.; Smith, M. & Wake, R. (1955) *Nature* 176, 738.
- Miyagi, K.; Kaneshina, M.; Kawakami, J.; Nakada, F.; Petryka, J. & Watson, C. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (12), 6172.
- Nelson, C. & Hummel, J. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 1567.
- Pluscec, J. & Bogorad, L. (1970) *Biochemistry* 9 (24), 4736.
- Radmer, R. & Bogorad, L. (1972) *Biochemistry* 11 (5), 904.
- Rossetti, M. (1978) Tesis Doctoral (UBA).
- Rossetti, M. & Batlle, A. (1977) *Int. J. Biochem.* 8, 277.
- Rossetti, M.; Juknat, de Geralnik, A.; Kotler, M.; Fumagalli, S. & Batlle, A. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 761.
- Rossetti, M.; Lombardo, E.; Juknat de Geralnik, A.; Araujo, L. & Batlle, A. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* 85 B (2), 451.
- Rossetti, M.; Araujo, L.; Lombardo, E.; Correa García, S. & Batlle, A. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.* 87 B (3), 593.
- Russell, C. & Rockwell, P. (1980) *FEBS lett.* 116, 199.
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969 a) *Biochim. Biophys. Acta* 191, 130.
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969 b) *FEBS lett.* 3 (3), 223.
- Sancovich, H.; Ferramola, A.; Batlle, A.; Kivilevich, A. & Grinstein, M. (1976) *Acta Physiol. Latinoam.* 26, 376.
- Schellma, J. (1955) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim.* 29, 230.

- Scott, E. (1976) *Prep. B-biochem.* 6, 147.
- Simpson, R. & Kauzman, W. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5139.
- Smythe, E. & Williams, D. (1988) *Biochem. J.* 251, 237.
- Steinhardt, J. (1938) *J. Biol. Chem.* 123, 543.
- Stella, A.; Parera, V.; Llambías, E. & Batlle, A. (1971) *Biochem. Biophys. Acta* 252, 481.
- Whitney, P. & Tanford, C. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, PC 1735.
- Williams, D. (1984) *Biochem. J.* 217, 675.
- Williams, D.; Morgan, E.; Mc Donald, E. & Battersby, A. (1981) *Biochem. J.* 193, 301.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio acerca de la purificación y caracterización de las enzimas deaminasa y PBG-asa provenientes de hígado de cerdo y eritrocitos humanos, pueden resumirse de la siguiente manera:

HIGADO DE CERDO

I. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LAS ENZIMAS

Como parte de los ensayos preliminares tendientes a establecer la secuencia de pasos a seguir para la obtención de una fracción parcialmente purificada de deaminasa, se investigó en primer término el uso de la diálisis y el tratamiento con ácido acético glacial, comprobándose que este último proceso purifica la enzima aproximadamente dos veces. Sin embargo, la diálisis contra agua destilada, la cual había sido efectiva para purificar deaminasas de otras fuentes ocasionó una importante pérdida de unidades enzimáticas.

Seguidamente se estudió el rango óptimo de saturación con sulfato de amonio, hallándose que la mayor parte de la actividad enzimática se halla concentrada en la fracción 35-55 %.

Se analizó, posteriormente, el efecto de un tratamiento a altas temperaturas, que como se sabe es uno de los procedimientos más frecuentemente utilizados para la purificación de la deaminasa. Los resultados mostraron que 65 °C y 10 minutos son las condiciones óptimas de calentamiento, no solamente porque aumenta la actividad específica aproximadamente 4 veces sin pérdida de unidades, sino también porque se forma un elevado porcentaje del Urogen I respecto del III.

Una vez realizados los ensayos preliminares, la secuencia de pasos finalmente adoptada para la purificación de la deaminasa fue la siguiente:

- Etapa 1: Homogenato

- Etapa 2: Sobrenadante
- Etapa 3: Tratamiento ácido
- Etapa 4: Fraccionamiento salino: 35 - 55 % de saturación
- ↖ Etapa 5: Calentamiento: 65 °C 10 minutos.
- Etapa 6: Cromatografía en Sephadex G-100

Se observa que las etapas 4, 5 y 6 purifican aproximadamente 4 veces y que el grado de purificación total alcanzado es de 150 veces.

Las etapas empleadas para purificar la PBG-asa fueron análogas a las descritas para la deaminasa, omitiendo el paso de calentamiento. Sin embargo, se intentaron agregar como pasos de purificación los tratamientos con geles de fosfato y con sulfato de protamina. Es de hacer notar que ambos procesos condujeron a resultados similares, pues causaron una pérdida apreciable de unidades enzimáticas y de proteínas, las cuales no pudieron recuperarse mediante los procedimientos empleados usualmente.

La secuencia de pasos finalmente adoptada fue la siguiente:

- Etapa 1: Homogenato
- Etapa 2: Sobrenadante
- Etapa 3: Tratamiento ácido
- Etapa 4: Tratamiento salino
- Etapa 5: Cromatografía en Sephadex G-100

En estas condiciones se obtuvo una fracción de PBG-asa purificada 35 veces. Es importante destacar que si bien sólo se logró purificar parcialmente la enzima, el procedimiento empleado fue sumamente reproducible obteniéndose siempre una purificación del mismo orden.

Se determinaron además, los PM's de ambas enzimas, los que fueron de 40.000 D para la deaminasa y 50.000 D para la PBG-asa, calculados por cromatografía en Sephadex G-100 y electroforesis en geles de poliacrilamida.

II. PROPIEDADES Y ESTUDIOS CINETICOS

Estos ensayos tuvieron por objeto estudiar comparativamente las propiedades de ambas enzimas y al mismo tiempo optimizar las condiciones de incubación.

En primer lugar se investigó el efecto de la atmósfera de incubación sobre las enzimas, observándose que la deaminasa es igualmente activa en presencia y ausencia de oxígeno y además, que la aerobiosis favorece la formación de Urogen I a expensas del III e inhibe a las decarboxilasas. Según estos hallazgos la atmósfera anaeróbica es la más conveniente para la determinación de la actividad de la PBG-asa, mientras que por razones prácticas se eligió la aeróbica para la deaminasa.

El estudio del efecto de la concentración proteica sobre la actividad enzimática mostró, para ambas enzimas, un incremento lineal en la formación de porfirinas y en el consumo de PBG.

Por otra parte, al investigar la variación de la actividad enzimática con el tiempo de incubación se observaron perfiles similares para ambas enzimas, tanto para la formación de producto como para el consumo de sustrato, no evidenciándose la presencia de una fase lag. Asimismo, señalaremos que el tipo isomérico de las porfirinas formadas por la PBG-asa se modificó notablemente con el tiempo, pues para períodos mayores a 4 horas el porcentaje de Urogen I se incrementó a expensas del isómero III, hasta alcanzar un 80 %.

En cuanto al pH óptimo de ambas enzimas, se obtuvieron valores de 7,4 para la deaminasa y de 7,6 - 7,8 para la PBG-asa, ambos en buffer Tris-HCl 0,05 M. Señalaremos además que, en los buffers fosfato de sodio y glicina la formación del producto es mucho menor.

Desde el punto de vista cinético la deaminasa y la PBG-asa se comportaron como enzimas típicamente michaelianas, con gráficos de inversas y de Eadiclineales y n de Hill cercanos a uno, determinados en base al producto formado. Asimismo, se estimaron los parámetros cinéticos, los cuales fueron:

$V_{max} = 12,5$ nmoles porfirinas/h, $K_m = 167 \mu M$ para la PBG-asa y
 $V_{max} = 1,70$ nmoles porfirinas/h, $K_m = 10 \mu M$ para la deaminasa.

En cuanto a la estequiometría de la reacción se observó que ésta es llamativamente diferente para ambas enzimas, hecho

que se justificó a través de la unión del HMB a un sitio, diferente del catalítico, lo que podría inducir cambios conformacionales sobre la deaminasa que condujeran a una inhibición en la síntesis de Urogen's. Asimismo, en el caso de la PBG-asa, el HMB no se liberaría de la deaminasa a la solución sino que sería captado inmediatamente por la isomerasa impidiéndose de esta forma que ocurra el conocido efecto inhibitorio ejercido por este intermediario.

III. OTRAS PROPIEDADES

Se estudió el efecto de reactivos protectores de grupos tioles y disulfuro sobre la actividad de deaminasa bajo condiciones de incubación diferentes, o sea, en anaerobiosis y aerobiosis con y sin preincubación. Los resultados indicaron que ni la atmósfera ni la preincubación produjeron efecto alguno. Se observó además que la cisteína hasta 50 mM no tiene acción y que el resto de los reactivos sólo inhiben a concentraciones mayores a 1 mM. Asimismo, todos ellos inhibieron más fuertemente la formación de producto que el consumo de PBG.

En forma análoga, se estudió el efecto de estos reactivos sobre la PBG-asa pero sólo bajo condiciones anaeróbicas. Los ensayos mostraron que la preincubación no produjo modificación alguna con esta familia de compuestos. También se observó que la cisteína hasta 50 mM y el GSH, ditioeritrol y tioglicolato a concentraciones menores o iguales a 1 mM no tuvieron efecto. Estos últimos reactivos a concentraciones superiores presentaron alguna acción, que al igual que antes fue sensiblemente mayor sobre la formación de producto que sobre el consumo de PBG.

De acuerdo a lo expuesto podemos asegurar que si bien la deaminasa y la PBG-asa son enzimas sulfhidrúlicas, no requerirían la presencia de reactivos protectores de grupos tioles para manifestar su actividad.

Por otra parte se investigó el efecto de inhibidores de grupos tioles y disulfuro, empleando para tal fin diferentes reactivos los cuales fueron agrupados de acuerdo a su conocida acción específica.

Nuevamente, la actividad enzimática se midió en aerobiosis y anaerobiosis en el caso de la deaminasa y en ausencia de

oxígeno en el de la PBG-asa, estudiando además el efecto de la preincubación. Los resultados no mostraron diferencias notables empleando las distintas condiciones de incubación.

Por otro lado, el efecto de los inhibidores sobre ambas enzimas fue similar, observándose que los agentes alquilantes en general inhiben más acentuadamente la formación de producto que el consumo de PBG, revirtiéndose dicha acción por el agregado de BAL y cisteína. Por su parte el grupo constituido por agentes oxidantes de grupos tioles afectó sensiblemente la reacción, en tanto que el arsenito a diferentes concentraciones mostró cierta acción sobre los restos monotioles. El efecto del grupo de reactivos que actúan sobre uniones disulfuro, demostró que este tipo de uniones no serían esenciales para la actividad. Finalmente fue clara la acción de los metales pesados sobre los restos sulfhidrilos. En base a estos hallazgos podemos decir que en las enzimas de hígado porcino existirían grupos tioles y disulfuros esenciales para la ciclización del urogen, los cuales sin embargo no requieren la presencia de reactivos protectores para manifestar la máxima actividad enzimática, sugiriendo que deben encontrarse en un entorno tal, constituido por restos aminoácidos, que los protegen de la oxidación.

En último lugar, se investigó el efecto de los iones ammonio, que inhibieron a la deaminasa y a la PBG-asa porcinas, observándose nuevamente que esta acción fue mayor sobre la formación de producto que sobre el consumo de PBG.

Posteriormente, se realizaron estudios tendientes a detectar la presencia de algún factor que regulara la actividad de la PBG-asa, como ocurre en otros tejidos. Sin embargo, los resultados demostraron que en hígado porcino, no existe ninguna molécula de bajo PM capaz de modular la actividad del complejo enzimático.

Se planteó no obstante la posibilidad de que el factor regulador de *Euglena gracilis* pudiese tener algún efecto sobre la PBG-asa y/o deaminasa de hígado de cerdo. Los resultados indicaron que aunque este factor activaba las enzimas de *E. gracilis*, no afectaba la actividad de la PBG-asa o de la deaminasa hepáticas. Podríamos concluir entonces, que es posible que en estos casos no exista sitio receptor para dicho compuesto o bien que la actividad de las enzimas se encuentre en su máxima expresión como para que este factor pueda modificarla.

ERITROCITOS HUMANOS

I. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LAS ENZIMAS

El primer paso en el proceso de purificación de la deaminasa de glóbulos rojos fue la eliminación de la Hb. Con este fin y dada la sencillez operativa, se seleccionó un tratamiento con solventes orgánicos, el cual inactivó las decarboxilasas y la mayor parte de la isomerasa.

Posteriormente, se intentó realizar sobre la fracción proveniente de este proceso una precipitación ácida, que causó una pérdida importante de unidades (aproximadamente 70 %), de manera que el tratamiento con ácido acético glacial no resultó útil como paso de purificación.

Seguidamente se estudió el efecto del calentamiento sobre preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas. Este proceso no sólo incrementó la cantidad de porfirinas formadas sino que causó una activación de la deaminasa. Este último resultado se justificó considerando que la isomerasa, aunque inactiva, podría permanecer asociada a la deaminasa, originando así una preparación más activa al ser removida por calentamiento.

Luego de los ensayos preliminares, la secuencia de purificación de la deaminasa, la cual produjo una enzima 3.400 veces más pura, fue la siguiente:

- Etapa 1: Tratamiento con solventes orgánicos
- Etapa 2: Fraccionamiento salino: 30 - 80 % de saturación
- Etapa 3: Calentamiento: 70 °C 15 minutos
- Etapa 4: Cromatografía en Sephadex G-100
- Etapa 5: Cromatografía en DEAE-celulosa

Es importante señalar que la preparación proveniente de la columna de DEAE-celulosa presentó una banda única de actividad enzimática. Este hecho se debió a que el calentamiento causa la desaparición de las bandas correspondientes a la enzima unida a los intermediarios.

Por otra parte, se realizaron una serie de ensayos preliminares tendientes a optimizar el proceso de purificación de la PBG-asa.

En primer término y teniendo presente que el tratamiento con solventes orgánicos inactiva casi totalmente la isomerasa, para eliminar la Hb se empleó DEAE-celulosa. Se observó que la utilización de este gel en batch era más efectiva que su empleo en columna. Se ajustó además, la técnica operativa mediante la selección de una serie de condiciones que permitieron mejorar el proceso de adsorción-desadsorción de la enzima a la DEAE-celulosa.

Posteriormente, se investigó la diálisis de la preparación enzimática contra agua destilada y el rango de saturación con sulfato de amonio. Los resultados mostraron que el proceso de diálisis inactiva la enzima cerca de un 94 %; por otra parte, en la fracción 30 - 70 % de saturación, se recupera el 94 % de la actividad de la enzima proveniente del tratamiento con DEAE-celulosa.

Una vez ajustadas las técnicas de purificación, la PBG-asa se purificó 950 veces, de la siguiente manera:

- Etapa 1: Hemólisis
- Etapa 2: Tratamiento con DEAE-celulosa en batch
- Etapa 3: Fraccionamiento salino: 30 - 70 % de saturación
- Etapa 4: Cromatografía en Sephadex G-100

Análogamente a las enzimas de hígado de cerdo, se determinó el PM empleando cromatografía en Sephadex G-100 y electroforesis en geles de poliacrilamida. Ambas técnicas permitieron estimar PM's similares, los cuales fueron de 37.000 - 38.000 D para la deaminasa y 23.000 - 25.000 D para la PBG-asa de eritrocitos. Dada la diferencia existente entre el PM de ambas enzimas, nosotros suponemos que la isomerasa podría estabilizar una forma enzimática de bajo PM con actividad de deaminasa, mientras que en ausencia de cosintetasa la deaminasa se hallaría en solución formando un agregado estable de mayor tamaño.

II. PROPIEDADES Y ESTUDIOS CINETICOS

Se llevaron a cabo estudios tendientes a analizar las propiedades de ambas enzimas, entre ellos se halla el efecto de la atmósfera de incubación sobre la actividad enzimática. Los

resultados son diferentes a los encontrados en otras fuentes, ya que se observó que las enzimas de eritrocitos humanos parcialmente purificadas poseen un requerimiento estricto por oxígeno.

Paralelamente, se investigó el efecto de la adición de una mezcla cloruro de sodio-cloruro de magnesio al sistema de incubación, la cual no afectó, o lo hizo levemente, la actividad de ambas enzimas.

Por otra parte, la concentración de proteína y el tiempo de incubación afectaron de manera similar a la deaminasa y a la PBG-asa. En ambos estudios las porfirinas formadas aumentaron en forma lineal y el sustrato consumido alcanzó rápidamente un plateau.

En cuanto al pH óptimo de la reacción, encontramos que el mismo fue de 7,4 para la deaminasa y 8,2 para la PBG-asa. En ambos casos el pico de actividad correspondió al buffer Tris-HCl 0,05 M, pues en los buffers fosfato y glicina de la misma molaridad las enzimas mostraron ser menos activas.

Los resultados cinéticos fueron diferentes para la deaminasa y la PBG asa de eritrocitos. La primera, si bien presentó curvas hiperbólicas en el gráfico de Michaelis Menten, mostró desviación de la linealidad, representaciones de Eadie en forma de campana y n de Hill cercano a 2 cuando la actividad se midió en función de las porfirinas formadas. Llamativamente, la PBG-asa se comportó como una enzima típicamente michaeliana.

El valor de los parámetros cinéticos aparentes, estimados a partir del gráfico de las inversas fueron de:

$V_{max} = 3 \text{ nmoles porf/mg.h}$, $K_m = 22 \text{ } \mu\text{M}$ para la deaminasa y
 $V_{max} = 40 \text{ nmoles porf/mg.h.}$, $K_m = 35 \text{ } \mu\text{M}$ para la PBG-asa.

Teniendo presente la diferencia entre los PM's de estas enzimas, la aparición de una única banda con actividad de deaminasa en preparaciones enzimáticas calentadas y además, el comportamiento cinético diferente, se propuso que la isomerasa podría incrementar las fuerzas que mantienen unido el PBG a su/s sitio/s activo/s.

Desde el punto de vista estequiométrico, la deaminasa mostró una relación que aumenta linealmente al variar la concentración de sustrato. Este comportamiento se adjudicó no sólo a que el HMB podría inhibir la enzima sino también al hecho

conocido de que el PBG inhibe a niveles superiores a 400 μM ,

Por su parte, la PBG-asa presentó una estequiometría diferente, justificada a través de una inhibición por producto.

III. OTRAS PROPIEDADES QUE CARACTERIZAN A LA DEAMINASA

Con el objeto de caracterizar la deaminasa de eritrocitos humanos se estudió el efecto de los iones amonio y de la hidroxilamina sobre la misma. Con este fin se realizaron experiencias paralelas en las cuales se preincubó o no con el inhibidor en ausencia de sustrato. Los resultados obtenidos con los iones amonio apoyarían la hipótesis del grupo de Battersby que señala que las bases nitrogenadas y el agua podrían competir por el intermediario azafulveno, inhibiendo de este modo la formación de Urogen I pero no el consumo de sustrato.

Sin embargo, la hidroxilamina inhibió en igual grado el consumo de PBG y la formación de porfirinas y además, la preincubación con este compuesto incrementó el porcentaje de inhibición. Este hecho podría indicar que esta base nitrogenada puede actuar no sólo a nivel de la formación de porfirinas, como el amonio, sino también afectando la unión del sustrato a su sitio, posiblemente induciendo un cambio conformacional en la enzima.

Posteriormente, se investigó el comportamiento cinético de la deaminasa en presencia de iones amonio. Analizando la variación de los parámetros cinéticos se concluyó que este catión ejerce una inhibición no competitiva, pues la V_{max} disminuye y el K_m aumenta al incrementarse la concentración del inhibidor.

En cuanto al efecto de distintos cationes sobre la actividad enzimática podemos concluir:

- a) los cationes sodio y potasio son inhibidores muy débiles;
- b) los iones magnesio y calcio inhiben la enzima con mayor intensidad que los iones monovalentes;
- c) los iones zinc, cadmio, cobre (II) y hierro (II y III) inhibieron fuertemente, probablemente debido a su unión con algunos grupos tioles esenciales de la enzima.

Asimismo señalaremos, que en todos los casos se inhibió más marcadamente la formación de porfirinas que el consumo de PBG.

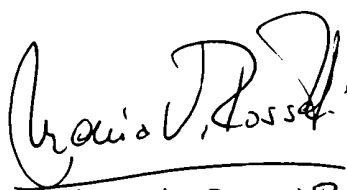
Además, la deaminasa no varía su comportamiento cinético en presencia de los cationes monovalentes sodio y potasio y de los divalentes calcio y magnesio a concentraciones menores o iguales a 1,5 mM.

En último término, se analizó el efecto de la urea sobre la enzima soluble e inmovilizada, con el objeto de investigar la estructura cuaternaria de la deaminasa.

Los estudios llevados a cabo con la fracción soluble mostraron que la urea desnaturaliza progresivamente la enzima; no obstante, las experiencias de reversión demostraron que la proteína es capaz de recuperar total o parcialmente su estructura nativa una vez eliminado el agente disociante.

Asimismo, la enzima inmovilizada, al igual que la soluble, se inactivó gradualmente por agregado de concentraciones crecientes de urea, no obstante, su unión a la matriz parece conferirle mayor estabilidad.

Los ensayos de disociación-reasociación de la deaminasa insolubilizada nos mostraron a la enzima como una proteína monomérica capaz de desnaturalizarse por acción de la urea y de replegarse nuevamente al ser removido el agente disociante. Sin embargo, no se puede descartar totalmente la posibilidad de que la urea no separe las subunidades, así como tampoco se puede desechar la hipótesis de que ambas cadenas polipeptídicas se unan al soporte.


Dña MARIA V. ROSSETTI

