

Tesis de Posgrado

Mecanismo de la porfiria inducida por hexaclorobenceno : Rol de sus metabolitos. Mecanismo de disminución de la porfirinógeno carboxi-liasa. Estudios del sitio activo

Billi de Catabbi, Silvia Cristina

1990

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:

Billi de Catabbi, Silvia Cristina. (1990). Mecanismo de la porfiria inducida por hexaclorobenceno : Rol de sus metabolitos. Mecanismo de disminución de la porfirinógeno carboxi-liasa. Estudios del sitio activo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2330_BillideCatabbi.pdf

Cita tipo Chicago:

Billi de Catabbi, Silvia Cristina. "Mecanismo de la porfiria inducida por hexaclorobenceno : Rol de sus metabolitos. Mecanismo de disminución de la porfirinógeno carboxi-liasa. Estudios del sitio activo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1990. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2330_BillideCatabbi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"MECANISMO DE LA PORFIRIA INDUCIDA POR HEXACLOROBENCENO".
- Rol de sus metabolitos. Mecanismo de disminución de la
porfirinógeno carboxi-liasa. Estudios del sitio activo.

SILVIA C. BILLI DE CATABBI

Director de Tesis: Dra. Leonor C. San Martín de Viale

Tesis para optar al título de
Doctor en Ciencias Químicas

- 1990 -

2330
ef. 2

Dedicatoria:

A mi esposo Juan Carlos.

A mis hijos Carolina y Santiago.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS.

- A la Dra. L. C. SAN MARTIN DE VIALE el haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo, por escuchar y aceptar ampliamente mis propuestas, por la libertad que me dió para investigar, por la confianza que siempre ha tenido, por su continuo estímulo y apoyo, por haber leído y corregido cuidadosamente este trabajo, por su asesoramiento constante.
- A la Dra. MARIA DEL CARMEN RIOS por haberme iniciado en las tareas de investigación, en especial la purificación de la porfirinógeno carboxiliasa. Por su colaboración en los estudios preliminares con DEPC.
- A la Dra. ROSA WAINSTOK DE CALMANOVICI por haberme guiado en los trabajos con desferrioxamina, por las ideas brindadas para el estudio del inhibidor. Por su estrecha colaboración y asesoramiento en la elaboración de resultados y discusión de estos temas.
- A las Dras. MARIA CRISTINA TAIRA y MARIA DEL CARMEN VILA por su asesoramiento en el trabajo con embriones de pollo.
- A la Dra. ALICIA POMILIO del Departamento de Química Orgánica, por su asesoramiento en la extracción del inhibidor, en el uso del cromatógrafo gaseoso, así como también, el haberme brindado parte de los medios materiales utilizados en este tema.

- Al Dr. G. KOSS por haberme cedido los metabolitos del HCB, por su colaboración en la discusión de parte los resultados referidos a este tema.
- A la Sra. CARMEN ALDONATTI por su muy eficiente asistencia técnica, por estar siempre dispuesta a ayudar, por su gran compañerismo.
- Al Sr. F. ORTEGA por el cuidado de los animales y la ayuda brindada con los mismos.
- A la Dra. A. HAEDO por su asesoramiento en la aplicación del test de Kruskal Wallis.
- A la Sra. LILIANA I. VAZQUEZ por el excelente trabajo dactilográfico realizado.
- A mi esposo JUAN CARLOS CATABBI por el trabajo de fotocopiado y compaginación de esta tesis, así como también su constante estímulo y su inmensa comprensión.
- A RAQUEL, JOSE y Ro por haber estado siempre dispuesto a cuidar mis hijos.
- A mis hijos CAROLINA y SANTIAGO por haberse tenido que adaptar a un ritmo de vida muy particular, sin haberlo elegido.
- A mis padres que me brindaron, la posibilidad de estudiar.

A todos ellos muchas gracias.

Parte de este trabajo de tesis dió origen a las siguientes publicaciones:

- "Ability of several hexachlorobenzene metabolites to induce porphyrin accumulation in chick embryo liver "in ovo".
S.C. Billi y L.C. San Martín de Viale.
Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. (1985), 35, 399-407.
- "Effect of desferrioxamine on the development of hexachlorobenzene-induced porphyria".
R. Wainstok de Calmanovici, S.C. Billi, C.A. Aldonatti y L.C. San Martín de Viale.
Biochem. Pharmac. (1985) 35, 2399-2405.
- "Screening for the ability of hexachlorobenzene metabolites to decrease rat liver porphyrinogen carboxy-lyase".
S.C. Billi, G. Koss y L.C. San Martín de Viale.
Res. Comm. Chem. Pathol. and Pharmac. (1986), 51 325-336.
- "Evaluación de la capacidad de la desferrioxamina para revertir una severa porfiria inducida por hexaclorobenceno".
R. Wainstok de Calmanovici, S.C. Billi, C.A. Aldonatti y L.C. San Martín de Viale.
Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. (1987), 37 541-554.
- "Studies on the active center of rat liver porphyrinogen carboxy-lyase "in vivo" effect of hexachlorobenzene on it".
Billi de Catabbi, S., Ríos de Molina, M. del C. and San Martín de Viale, L.C.
Enviado a Biochem. and Cell. Biol.

Parte de este trabajo fué presentado en el Congreso Internacional sobre Hexaclorobenceno, realizado en Lyon, Francia en 1985 y fueron publicados en :
Hexachlorobencene: Proceedings of an international Symposium.
(C.R. Morris Y J.R.P. Cabral ed.) IARC Scientific Publications
NO 77 (1986).

- "Rat-liver porphyrinogen carboxy-lyase inhibition as a function of the degree of hexachlorobenzene-induced porphyria".

S.C. Billi, R. Wainstok de Calmanovici y L.C. San Martín de Viale.

pp. 487-491.

- "Ability of several hexachlorobenzene metabolites to decrease rat-liver porphyrinogen carboxy-lyase and to produce porphyrin accumulation in chick embryo liver".

S.C. Billi, G. Koss y L.C. San Martín de Viale.

pp. 471-476.

- "Effect of an iron chelator on the onset of hexachlorobenzene-induced porphyria in rats".

R. Wainstok de Calmanovici, S.C. Billi, C.A. Aldonatti y L.C. San Martín de Viale.

pp. 507-511.

ABREVIATURAS.

ENZIMAS.

ALA-S: aminolevulinato sintetasa.
ALA-D: aminolevulinato dehidrasa.
PBG-D: porfobilinógeno deaminasa.
PCL: porfirinógeno carboxi-liasa.
Coprogenasa: coproporfirinógeno oxidasa.

SUSTRATOS.

Gli: glicina.
CoA: coenzima A.
ALA: ácido delta aminolevúlico.
PBG: porfobilinógeno.

a) Porfirinógenos.

Uro'gen: uroporfirinógeno.
Firia'gen: firiaporfirinógeno.
Hexa'gen: hexaporfirinógeno.
Penta'gen: pentaporfirinógeno.
Copro'gen: coproporfirinógeno.
Proto'gen: protoporfirinógeno.

b) Porfirinas.

Uro: uroporfirina.
Firia: firiaporfirina.
Hexa: hexaporfirina.
Penta: pentaporfirina.
Copro: coproporfirina.
Proto: protoporfirina.

DROGAS.

AIA: alilisopropilacetamida.

DDC: 3,5-dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina.

DMSO: dimetilsulfóxido.

HCB: hexaclorobenceno.

PCB: pentaclorobenceno.

TCB: tetracolorobenceno.

PCF: pentaclorofenol.

TCH: tetracolorohidroquinona.

TrCF: triclorofenol.

TCF: tetracolorofenol.

PCTF: pentaclorotiofenol.

PCTA: pentaclorotioanisol.

TCTA: tetracolorotioanisol.

PCTA-O: 1-metil-(2,3,4,5,6-pentacolorofenil)-sulfóxido.

PCTA-O₂: 1-metil(2,3,4,5,6-pentacolorofenil)-sulfona.

FB: fenobarbital.

DF: desferrioxamina.

DEPC: dietilpirocarbonato.

GSH: glutation.

EDTA: etilendiamino tetraacético.

TCA: tricloroacético.

Tris: trihidroximetilaminometano.

AcONa: acetato de sodio.

AcH: ácido acético.

SDS: sodio dodecil sulfato.

Otros.

PCT: porfiria cutánea tarda.

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida.

I N T R O D U C C I O N

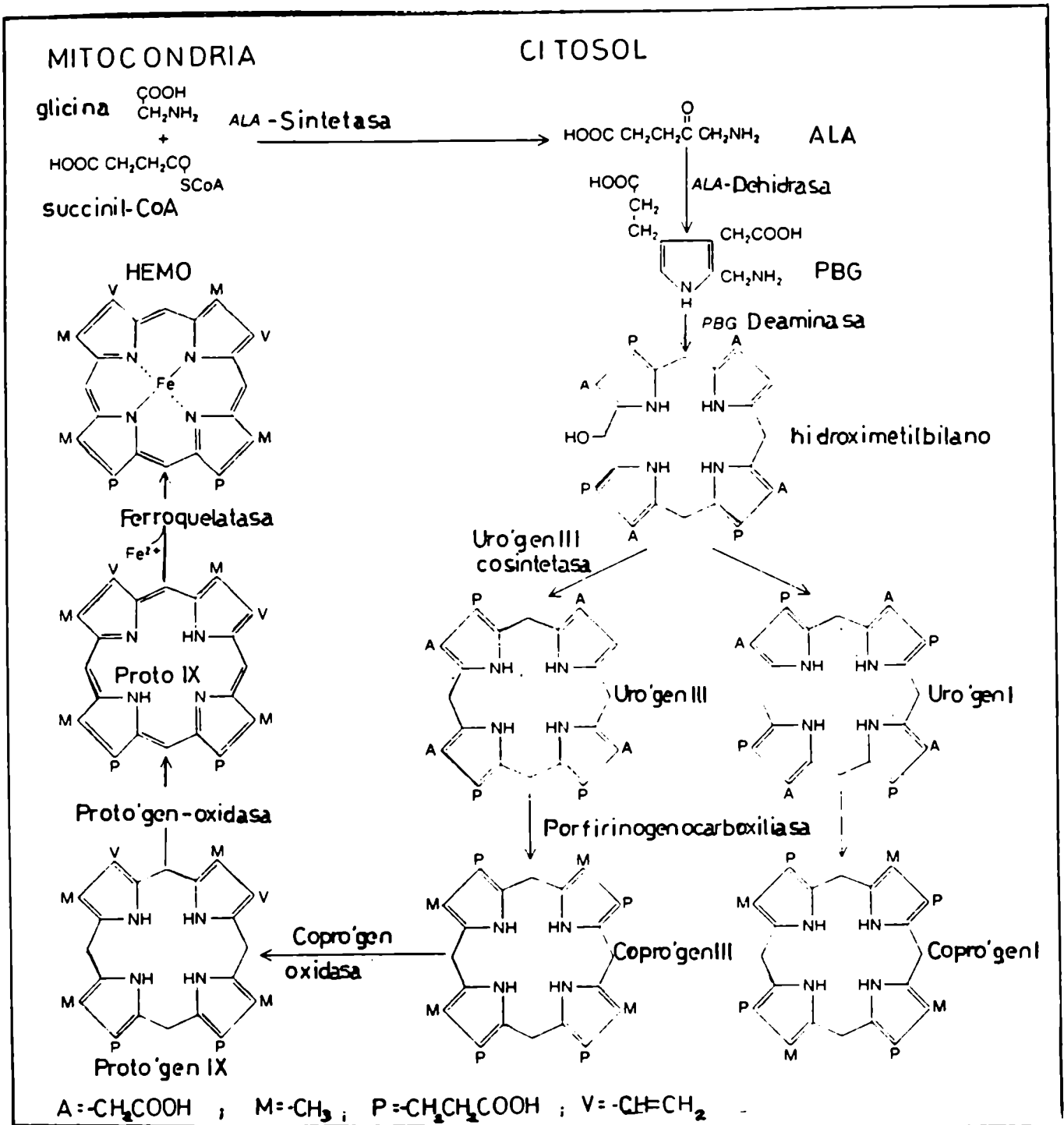
HEMO.

El hemo es un pigmento rojo formado por cuatro subunidades llamadas pirroles que se ensamblan para formar el anillo de porfirina y en el centro del mismo esta quelado el átomo de hierro. En los sistemas fisiológicos el hemo esta unido a ciertas proteínas y estas hemoproteínas estan ligadas a funciones de vital importancia para la vida. Así la hemoglobina y la mioglobina estan ligadas a la unión y transferencia de oxígeno, los citocromos P-450, B₅ a oxidación y biotransformación de drogas, esteroides, ácidos grasos, vitamina D y leucotrienos, los citocromos, A, B y C a la transferencia de electrones y respiración celular, las peroxidasas (citocromo c peroxidasa, lactoperoxidasa, peroxidasa tiroidea, mieloperoxidasa) a oxidación de H₂O₂, catalasa a inactivación de H₂O₂ y triptofano pirrolasa al metabolismo del triptofano y a la regulación del "pool" de hemo.

En contraste con la gran importancia biológica del hemo no se ha encontrado rol fisiológico para las porfirinas.

BIOSINTESIS DEL HEMO.

La biosíntesis del hemo (Fig. 1) comienza en las mitocondrias por condensación de glicina (gli) y succinil coenzima A (Succ CoA) para dar el ácido 5-aminolevúlico (ALA) catalizado por la enzima ALA-sintetasa (ALA-S), siendo esta primer enzima de fundamental importancia para la



regulación de la biosíntesis del hemo. El ALA sale de mitocondrias y en el citoplasma por acción de la enzima ALA-dehidrasa (ALA-D) dos moléculas de ALA forman el pirrol porfobilinógeno (PBG). La condensación química de cuatro moléculas de PBG da origen a cuatro isómeros posibles del tetrapirrol uroporfirinógeno (Uro'gen) (Fig. 2) pero por acción de dos enzimas la hidroximetilbilano sintetasa y la Uro'gen III sintetasa se forma el isómero III. Cabe aclarar que los porfirinógenos que son los intermediarios del camino, son los estados reducidos (6 átomos de H extra) de las porfirinas donde los puentes metilénicos están oxidados. Estas últimas tienen color y emiten la característica fluorescencia roja por excitación con luz ultravioleta (Fig. 3)). El Uro'gen III por decarboxilación de sus grupos acetilos catalizado por la porfirinógeno carboxi-liasa (PCL) da origen al coproporfirinógeno III (Copro'gen III). Este último en mitocondrias por acción de la coproporfirinógeno oxidasa (Coprogenasa) forma el protoporfirinógeno IX (Proto'gen IX) y la protoporfirinógeno oxidasa lo oxida a protoporfirina IX (Proto). Finalmente la ferroquelatasa cataliza la inserción de un átomo de Fe dando origen al hemo. La degradación del hemo ocurre a través de dos enzimas la hemoxigenasa y la bilirubina reductasa.

Bajo condiciones normales la cantidad de porfirinas y precursores que se acumula o es excretada es muy pequeña, esto indicaría que el camino biosintético está muy eficientemente regulado, manteniendo la concentración de hemo en

Fig.2 ISOMEROS DEL UROPORFIRINOGENO

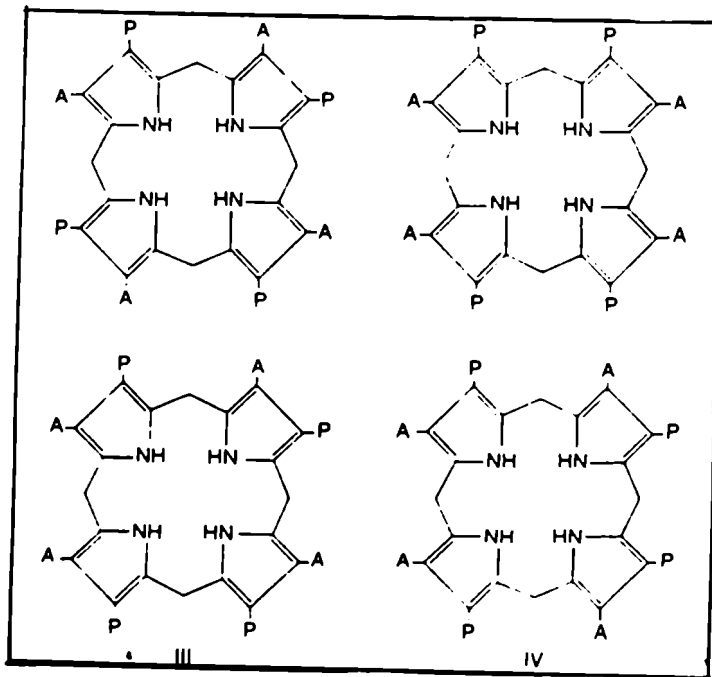
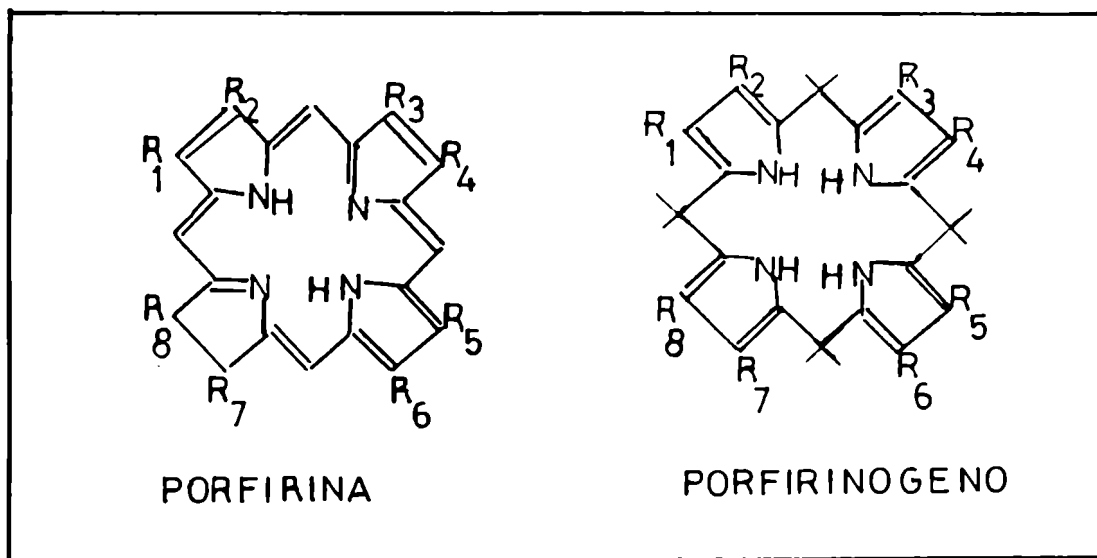


Fig.3 ESTADOS DE OXIDO-REDUCCION DE LAS PORFIRINAS



un estado estacionario. En las enfermedades conocidas como porfirias se producen disturbios del camino metabólico tal que el mecanismo de control se quiebra y se sintetizan más porfirinas y precursores que los que llegan a convertirse en hemo por lo tanto se acumulan y excretan en grandes cantidades (1).

1- 5-Aminolevúlico sintetasa .

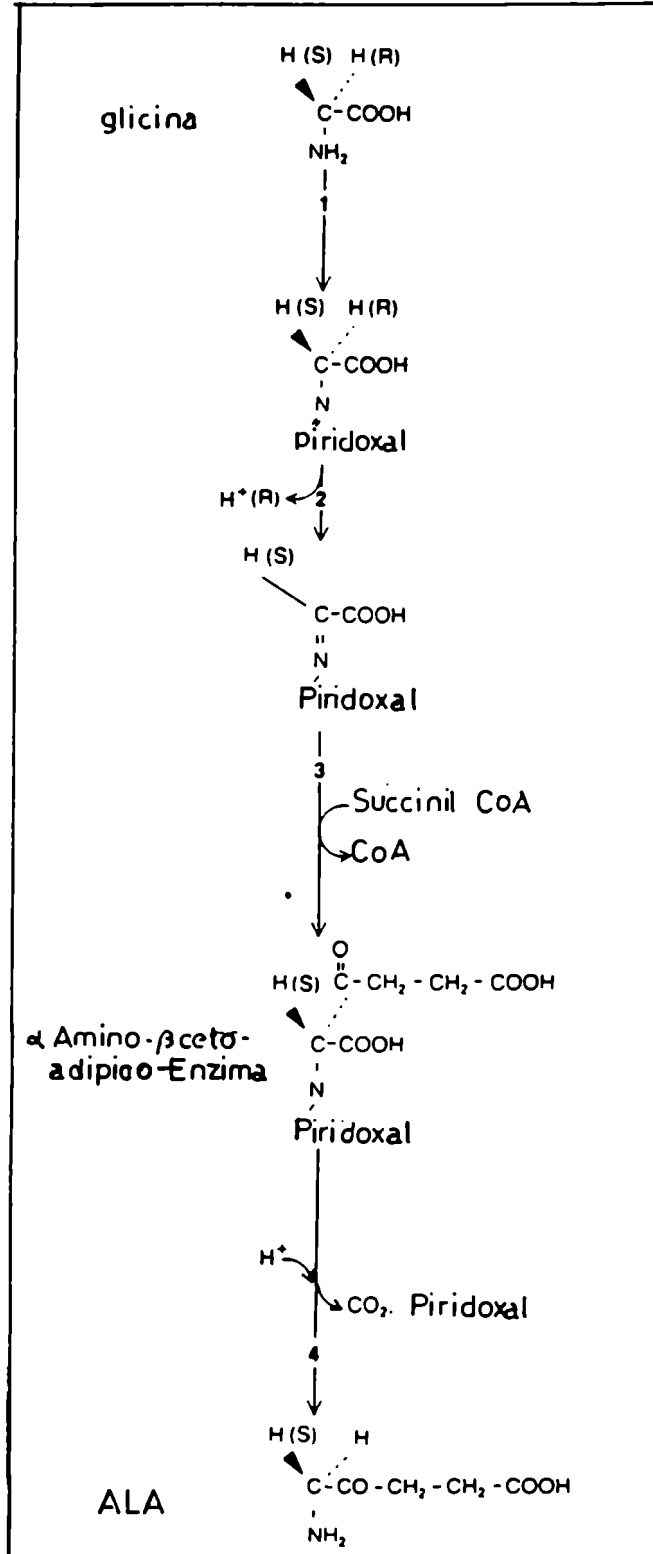
La enzima ALA-sintetasa (ALA-S) (EC.2.3.1.37) fué descrita en todos los sistemas vivientes que sintetizan tetrapirroles. Los primeros trabajos se realizaron en eritrocitos de pollo (2) y en Rhodopseudomonas spheroides (3).

Respecto al mecanismo de acción (Fig. 4) se sabe que la enzima necesita fosfato de piridoxal (PPy) que se uniría a ella a través de un -SH o una lisina del sitio activo, luego forma una base de Schiff con gli, se remueve un protón de configuración R del C metileno de la gli, y succinil CoA se condensa con el carbanion para formar el ácido α NH_2 , β cetoadípica ., luego se decarboxila y se libera el ALA (3, 4, 5, 6).

Esta enzima se ha localizado en la matriz mitocondrial debilmente unido a la membrana interna (7).

La ALA-S es la enzima de velocidad limitante y regulatoria de este camino biosintético, siendo regulada por el producto final hemo (8, 9, 10). En condiciones fisiológicas normales se encuentran bajas cantidades de enzimas en mitocondrias hepáticas, pero aumenta considerablemente

FIG.4 REACCION CATALIZADA POR ALA-SINTETASA



por acción de drogas porfirinogénicas (9, 11). El ALA-S se sintetiza en polirribosomas citoplasmáticos como un precursor de largo peso molecular que luego se incorpora y procesa en la matriz mitocondrial (12, 13, 14, 15). En condiciones fisiológicas normales no se detecta actividad en citoplasma pero bajo la acción de agentes porfirinogénicos aumenta la actividad citoplasmática en ratas y pollos adultos, pero no en embrión de pollo (16, 17). Ades y Stevens(17) suponen que en animales adultos dado el limitado nivel de crecimiento hepático, se debe de minimizar la actividad del mecanismo responsable de translocar las proteínas recientemente sintetizadas permitiendo así su acumulación.

En la última década varios grupos de trabajo purificaron la enzima a homogeneidad de varias especies, tanto mitocondrial como citoplasmática. El rango de pesos moleculares (PM) informados es amplio dado que la enzima forma agregados de alto peso molecular y también sufre degradación proteolítica (18, 19). Watanabe y col. (20) presentaron datos de PM para enzima de pollo aislada y sintetizada "in-vitro" de 75.000 y 65.000 para la citoplasmática de hígado y de 65.000 y 53.000 para la de eritrocitos.

También informan las determinaciones de PM por SDS/PAGE e inmuno precipitación para ALA-S de hígado de pollo, siendo los valores obtenidos para la mitocondrial de 65.000 coincidiendo ambas técnicas y para la citoplasmática de 71.000 y 73.000. Cuando utilizan gradiente de sacarosa el valor hallado fué de 140.000 tanto para la mitocondrial como lo

citoplasmático (15). Los datos más recientes en eritrocitos de pollo fueron de 62.000 por SDS/PAGE y 115.000 por filtración por geles (17).

Pirola y col. (21) realizaron estudios de microscopía electrónica de la enzima hepática de pollo y el modelo obtenido corresponde a una molécula formada por dos subunidades idénticas de PM aproximado 70.000. Confirmado en parte por estudios de entrecruzamiento con glutaraldehído que sugirieron que la enzima mitocondrial de embrión de pollo es un dímero formado por subunidades idénticas (22).

Respecto a las propiedades cinéticas se ha informado valores de Km para gli entre 1 y 12 mM y para succinil CoA 3 - 70 μ M de las distintas fuentes estudiadas (4, 18, 23).

Estudios comparativos de la forma precursora y madura de ALA-S dió como resultado que: 1) ambos estaban como dímeros, 2) los puntos isoeléctricos fueron de 7,5 y 7,1 para la citoplasmática y la mitocondrial respectivamente, 3) la forma precursora tiene una secuencia extra rica en aminoácidos básicos que no afecta la formación del dímero ni las propiedades cinéticas (15). Recientemente Borthwick y col. (24) aislaron la secuencia nucleotídica completa del precursor de ALA-S hepática, encuentran que es 61 KD más grande que la forma madura, que se procesa en la translocación a mitocondrias y presumen que la maduración ocurre a través del clivaje de la secuencia N-terminal. Reportaron la estructura primaria del precursor y la secuencia nucleotídica;

para la proteína madura obtienen un PM de 63.963 Da con 579 aminoácidos y para el precursor citoplasmático de 70.029 Da con 635 aminoácidos, siendo entonces la presencia de 56 aminoácidos y de 6,1 KD , rica en aminoácidos básicos.

Watanabe y col. (20) suponen que el ALA-S se presenta como isoenzimas en hígado y eritrocitos y que existen mecanismos de regulación distintos ya que la enzima eritroide no es inducible por drogas que sí inducen la hepática, no se acumula en citoplasma por hemina, las enzimas presentan distintos PM cuando se sintetizan "in vitro" o se aíslan; los anticuerpos contra la de hígado da reacción cruzada parcial contra la eritrocitaria. En igual sentido Yamamoto y col. (25) determinaron que el ALA-S está codificado por una familia de multigenes cuyos miembros son responsables de la diferencia en respuesta a los estímulos y regulación durante el desarrollo. Sin embargo Eljerink y col. (26) demuestran que el ALA-S esta codificada por un único gen de 6,9 Kb que se expresa como un único mRNA de 2,2 Kb en todos los tejidos, suponen que la diferencia en inducibilidad de la enzima se debe a que en hígado por acción de drogas se destruye al P-450 por lo tanto disminuye el hemo, y en eritrocitos la falta de P-450 impide este tipo de respuesta.

1.2. Regulación de ALA-S.

Ciertas drogas producen disturbios del camino metabó-

lico del hemo que se asemejan a aquellas producidos en los distintos tipos de porfirias. El camino para elucidar el mecanismo de acción de estas drogas lo abrieron Granick S. y Urata G. (27) trabajando con dietildihidrocolidina (DDC) vieron que esta droga aumentaba la actividad de ALA-S, posteriormente (9) se encuentra que el hemo impide la inducción por alilisopropilacetamida (AIA) del ALA-S, determinandose que el control del ALA-S en hígado se realiza por retroalimentación negativa donde el hemo actuaría como corepresor y no encuentran inhibición por hemo. Lascelles (28) propone para la ALA-S dos mecanismos de regulación, represión e inhibición por hemo.

Kurashima y col. (29) reportan que AIA produce el aumento de ALA-S mitocondrial, y citoplasmática y que hemina actuaría a un nivel primario de la inducción y además inhibiría la translocación de la proteína de citoplasma a mitocondrias.

Sassa y Granick (11) determinan que DDC y esteroides actúan a nivel de transcripción mientras que AIA y lindano a nivel de translación, suponen que hemina o inhibe a nivel de traducción, compitiendo con los inductores por un sitio especial o disminuye la vida media del mRNA.

Scholnik y col. (4) encuentran inhibición con hemina de la ALA-S con un K_i 2×10^{-5} M pero es 200 veces mayor que el necesario para reprimir en cultivo la síntesis de la enzima (30).

Sinclair y Granick (10) postulan que 1) las drogas

actuarían induciendo la síntesis de mRNA de ALA-S, permitiendo el aumento de síntesis de hemo y que habría un control post transcripcional por retroalimentación por hemo ya sea a nivel de transporte de mRNA al citoplasma o a polirribosomas o transporte de la enzima a mitocondrias, 2) las drogas podrían bloquear la síntesis de hemo para impedir su formación o podrían destruir al hemo o podrían aumentar la degradación del hemo. Si el hemo bloquea la síntesis de la enzima a nivel de traducción; las drogas previniendo su formación desbloquearían el sistema.

Actualmente se sabe que AIA y DDC forman aductos con la protoporfirina de la mitad hemina del citocromo P-450 y que el DDC inhibe la ferroquelatasa (31 y referencias allí citadas).

Kikuchi y col. (32) y Marks y col. (31) entonces plantean que AIA y DDC depletan el "pool" de hemo por destrucción del mismo y que el hemo regula los niveles de ALA-S actuando en tres sitios: 1) síntesis de mRNA, 2) a nivel post transcripcional y 3) en la translocación de la enzima de citoplasma a mitocondria.

Recientemente Hamilton y col. (33) determinaron el efecto de drogas, inhibidores de la biosíntesis de hemo y cicloheximida en la expresión del estado estacionario del mRNA para ALA-S y el citocromo P-450 inducible por fenobarbital (FB) concluyen que: 1) drogas similares al FB inducen la transcripción de mRNA de ALA-S y citocromo P-450 simultáneamente, 2) no encuentran evidencias que avalen el modelo

corriente donde ALA-S es sólo regulada por hemo, 3) la actividad de ALA-S es más sensible a cambios en la concentración de hemo que la expresión de mRNA. Proponen como sitio principal de regulación del hemo el post-transcripcional a nivel de transporte de la enzima a mitocondrias, indican la presencia de represores protéicos para los genes de ALA-S y citocromo P-450 separados, siendo el de ALA-S sensible a hemo.

Está ampliamente aceptado que el factor principal en la regulación del metabolismo del hemo es el tamaño de un pequeño "pool" de hemo. Una deficiencia del mismo permitiría la derepresión de ALA-S y un exceso permitiría la disminución de actividad de la enzima y la inducción de hemo-oxigenasa (degradación del hemo).

Grandchamp y col. (34) proponen para la distribución del hemo dentro del hepatocito un modelo de cuatro compartimentos que consta de 1) "pool" de hemo libre, 2) hemo que pasa a pigmentos biliares, 3) hemo asociado a proteínas microsomales (citocromos) y 4) hemo unido a proteínas solubles. En cultivo de células los autores encuentran que un 20% de hemo va a pigmentos biliares y un 80% a hemoproteínas (64% en microsomas y 16% soluble). Consideran que la enzima triptofano pirrolasa esta asociada al "pool" de hemo libre o a las proteínas solubles.

La triptofanopirrolasa es una enzima citosólica dependiente de hemo que cataliza el clivaje del anillo pirrólico del triptofano para formar N-formilkinurenina en el

primer paso de la degradación del triptofano. En condiciones normales de metabolismo de hemo, el hígado contiene suficiente hemo para saturar la apoenzima aún cuando su síntesis está estimulada por hormonas. La saturación de la enzima por hemo, aumenta por tratamientos que incrementan la disponibilidad de hemo (FB, ALA) y disminuye por un decremento en la disponibilidad de hemo ya sea por su destrucción (AIA, DDC), degradación o inhibición de su síntesis. Se sugiere que la utilización de hemo por la enzima es un fenómeno versátil que le confiere a la enzima un rol único entre las hemoproteínas hepáticas. El citocromo P-450 y catalasa utilizan un 82% del hemo pero sólo responden en condiciones de grosera disminución de hemo, en cambio la triptofanopirrolasa responde a cambios finos en la concentración del hemo, por lo tanto jugaría algún rol en la regulación de la biosíntesis del hemo (35). La depleción del hemo de esta enzima es un fenómeno temprano en la secuencia de eventos que lleva a la producción de porfiria por AIA y antecede a la disminución del citocromo P-450 y de la catalasa y parece ser un blanco constante durante el tiempo de inducción de actividad de ALA-S (36). La dosis de hemina que causa la saturación total de triptofano pirrolasa también produce máximos efectos en la ALA-S, la inhibición de la translocación de la enzima se logra a concentraciones de hemina menores que las necesarias para lograr la saturación total de triptofanopirrolasa en ratas inducidas con AIA. En animales normales dosis de hemina similares inhiben la translocación

de ALA-S y su síntesis (32).

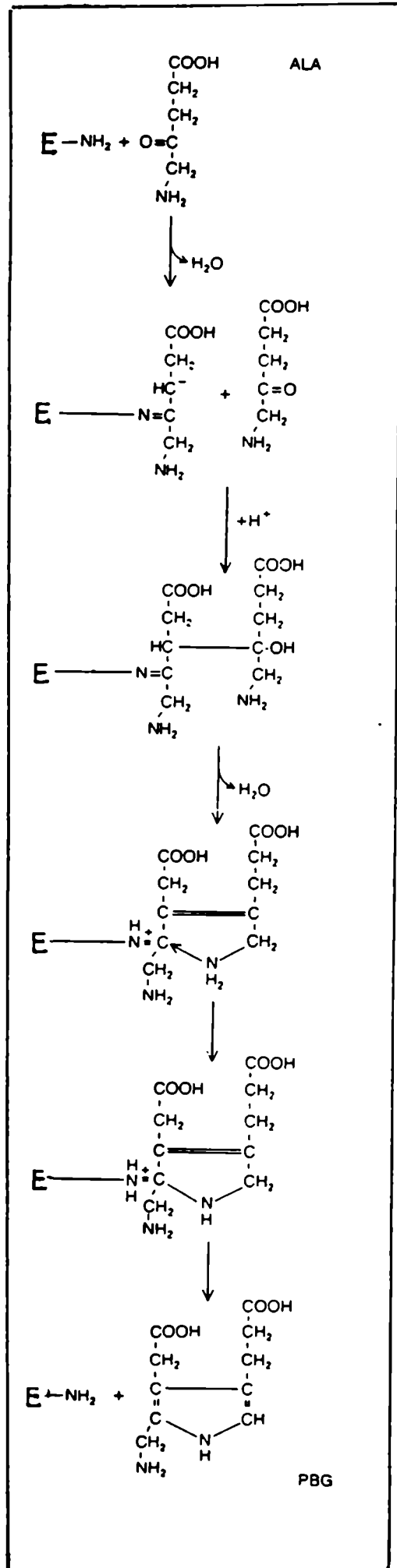
2- 5-Aminolevúlico Dehidratasa.

La enzima 5-aminolevúlico dehidratasa (ALA-D) (EC. 4.2.1.24.) cataliza esencialmente una condensación de Knorr de dos moléculas de ALA para dar porfobilinógeno (PBG). En el mecanismo propuesto por Nandi y Shemin (37) para Rhodopseudomonas spheroides un residuo lisina de la enzima forma una base Schiff con la molécula de ALA que da origen al lado del sustituyente acético del PBG. Jordan y Seehra (38) y Jordan y Gibbs (39) trabajando con la enzima de hígado bovino y de eritrocitos humanos encuentran que la molécula de ALA que da origen al sustituyente propiónico es la que se une a la enzima (Fig. 5).

La enzima ha sido purificada y caracterizada en diversas fuentes. Se ha informado que está formada por múltiples subunidades, que el PM varía de 240.000 a 280.000 en las distintas fuentes (40, 41). Se ha informado que la enzima de mamíferos y eritrocitos humanos está formada por 8 subunidades idénticas de PM 35.000, ordenadas en una estructura cúbica octamérica con simetría dihedral (42, 43).

Los valores de Km para ALA informados son de aproximadamente $1 a 4 \times 10^{-4}$ M (40).

Se ha encontrado residuos cisteína en el sitio activo que son muy reactivos sugiriendo que participarían en la catálisis ácido base requerida para la secuencia de protonación desprotonación de la síntesis de PBG (44). Tsukamoto



E: enzima

y col. (45) informan que el sitio activo de la enzima de hígado bovino estaría formado por dos residuos cisteínas, dos histidinas y un átomo de Zn^{2+} ; un grupo -SH sería esencial para la activación y estaría protegido por coordinación de un -SH adyacente con Zn^{2+} . Asimismo determinan que la enzima tiene ocho átomos de Zn^{2+} por octámero, Hasnain y col. (46) por estudios de absorción con rayos X encuentran que la ALA-D tiene ocho átomos Zn^{2+} por octámero, establecen que está coordinado a tres átomos de azufre y sugieren que el Zn^{2+} tiene rol estructural más que catalítico en la síntesis de PBG. Jaffe y col. (47) encuentran que Zn^{2+} no es necesario para la formación de la base de Schiff y ningún -SH está involucrado en los pasos que preceden e incluyen la formación de la base Schiff en la enzima de hígado bovino; los resultados avalan cuatro sitios activos por enzima octamérica o que la enzima tiene ocho sitios activos, la mitad de los cuales presenta muy baja velocidad de reacción o muy baja afinidad por el sustrato.

Una propiedad interesante de la ALA-D de eritrocitos humanos es que su actividad es un indicador muy sensible de intoxicación por plomo, Zn^{2+} revierte completamente la inhibición inducida por Pb^{2+} "in vivo" e "in vitro", aparentemente ambos metales interactuarían en dos sitios distintos de la enzima y por distintos mecanismos (48).

Bishop y col. (49, 50) aislan 3 clones de cDNA para la ALA-D, un clon ALA-D1 (base 73-747) ALA-D₃ (48-412) y ALA-D7 (base 433-1071).

3- Porfobilinógeno Deaminasa-Uroporfirinógeno III Co-Sintetasa.

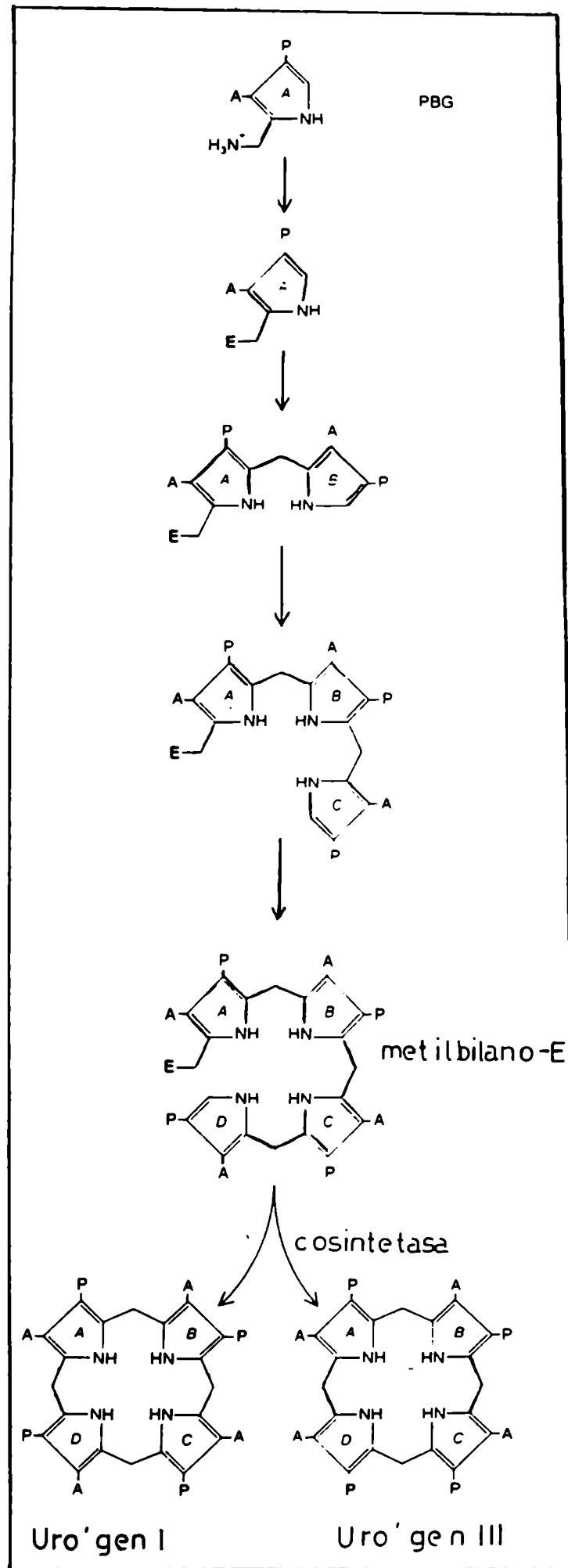
La biosíntesis del Uro'gen III es llevada a cabo por dos enzimas, la porfobilinógeno deaminasa (PBG-D) (EC. 4.3.1.8) o Uroporfirinógeno I sintetasa o hidroximetilbilano sintetasa y la uroporfirinógeno III coeintetasa o isomerasa. La primera produce la condensación cabeza cola de cuatro moléculas de PBG para generar un tetrapirrol lineal hidroximetilbilano, que luego se utiliza para formar Uro'gen I, en ausencia de cosintetasa, cuando esta enzima está presente se produce la inversión del anillo D dando origen al Uro'gen III (51, 52) (Fig. 6).

Estudios del sitio activo de la deaminasa involucran grupos sulfhidrilos, arginina, lisina y aspártico o glutámico (53, 54, 55).

Recientemente se ha descrito que la deaminasa aislada de Escherichia coli contiene un cofactor dipirrometano unido covalentemente a la enzima que estaría involucrada en la unión de intermediarios durante la reacción y no se incorporaría en el producto (5-6). Este cofactor estaría unido a través del átomo de azufre de un residuo cisteína (57).

Las dos enzimas pueden distinguirse por su diferente susceptibilidad a inactivarse por calor, siendo la deaminasa estable y la cosintetasa inestable. Por métodos no destructivos en eritrocitos humanos se pudo estimar la cantidad de cosintetasa presente en el sistema indicado que estaba en gran exceso sobre la deaminasa proponiendo que este hecho aseguraba la formación de solo Uro'gen III, la cosintetasa

Fig.6 REACCION CATALIZADA POR PBG-DEAMINASA Y UROPORFIRINOGENO III COSINTETASA



no tiene actividad con Uro'gen I ó PBG (53, 58, 55, 60).

Las enzimas fueron purificadas de varias fuentes, las diferencias de PM encontradas se ha propuesto que son debido a que en distintos organismos se presentan con distinta estructura cuaternaria (61). Se ha informado para las deaminasas de distintas fuentes valores de PM entre 36.000-44.000 (40, 62, 63, 64). Purificando la Uro'gen I-S se ha encontrado que en cromatografía en DEAE celulosa se resuelve en cinco picos, suponiendo por otros estudios realizados que se deben a la enzima con distinto número de PBG unido (62). Para la isomerasa se han reportado valores de PM alrededor de 30.000 (64, 65).

Jordan y col. (62) purificaron y cristalizaron la deaminasa de una cepa recombinante de *Escherichia coli* que contiene el plásmido hem C, lo que permitió obtener miligramos de enzima pura, el PM reportada derivado del gen fué de 33.857. Los valores de Km reportados para PBG estarían en el rango de 6-19 μM y para hidrometilbilano 12-40 μM (40, 62, 63, 65).

Romeo y col. (66) encuentran un único tamaño de mRNA para la enzima de 1.800 bases y suponen que estaría regulado a nivel pre-transduccional pues la cantidad de mRNA fué dependiente de la naturaleza del tejido y del grado de proliferación celular.

Posteriormente Grandchamp y col. (67) comparando la deaminasa de células eritropoyéticas y no eritropoyéticas proponen que un único gen se transcribe a partir de dos

promotores distintos rindiendo dos formas de mRNA. Stubmicer y col. (68) secuenciando el cDNA de la forma eritropoyética reportan que el gen de PBG-D da origen a dos mRNA estando uno de ellos en células eritropoyéticas y el otro es ubicuo.

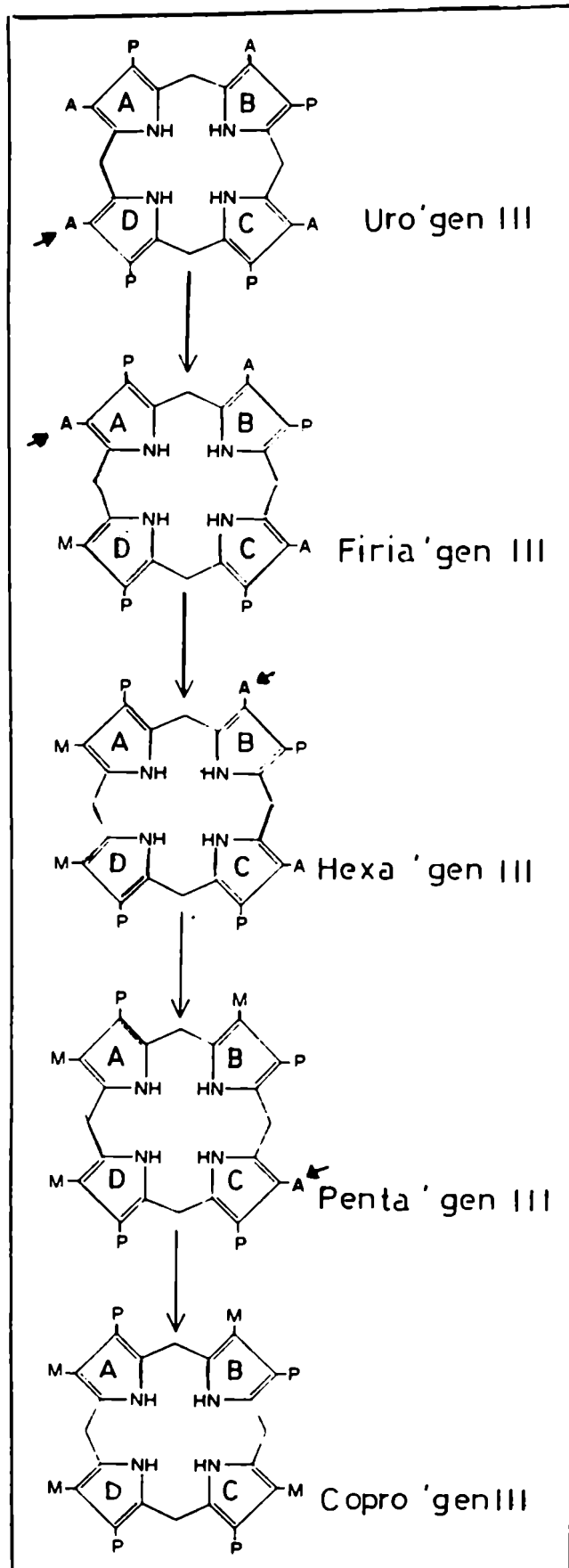
El locus genómico que codifica para la PBG-deaminasa humana fue localizado en el cromosoma 11 usando células híbridas de hombre y ratón (69).

4- Porfirinógeno carboxilasa.

La porfirinógeno carboxilasa (PCL) (E.C. 4.1.37) es la enzima citosólica que cataliza la remoción de los 4 grupos carboxilos de las cadenas laterales de acetilos del uroporfirinógeno (Uro'gen) para dar el coproporfirinógeno (Copro'gen) (70,71, 72). (fig. 7).

4-1. Mecanismo de acción.

La enzima utiliza como sustratos sólo los estado reducidos de las porfirinas, esto es los porfirinógenos (70-72). Los cuatro isómeros del Uroporfirinógeno son sustratos de la PCL (72-75) aunque con distintas velocidades de reacción. Numerosos grupos de trabajo encontraron que el isómero fisiológico III se decarboxila más rápidamente que el isómero I (72, 74-80) San Martín de Viale y col. (75) determinaron que las velocidades de reacción para los cuatro isómeros son Uro'gen IV > III > II > I. Contrariamente Romeo y Levin y Kushner y col. encontraron igual velocidad de reacción para



el isómero III y el I (81, 82). San Martín de Viale y col. (75) analizando las velocidades de decarboxilación de los cuatro isómeros del Uro'gen, concluyen que la eliminación de un carboxilo de un grupo acetilo que se encuentra entre un acetilo y un propiónico es más fácil, que si se halla entre dos propiónicos o un metilo y un propiónico, y que uno o los dos propiónicos de las posiciones dos y cuatro son importantes para la unión de los tetrapirroles a la enzima así como el estado reducido de los mismos. Por otro lado Cantoni y col. (78) sugieren que Uro'gen I induce cooperatividad negativa quizás relacionado a la distinta posición de las cadenas laterales de los dos isómeros, el anillo D de Uro'gen III tiene una posición de las cadenas laterales que favorecerían la formación de un complejo inicial enzima sustrato específico y la sucesiva orientación y rotación del sustrato para las decarboxilaciones, en la molécula del isómero I las interacciones serían menos eficientes dado que no tiene la marca identificatoria.

La decarboxilación ocurre en forma secuencial formándose los intermediarios con menor número de carboxilos (Fig. 7); Batlle y Grinstein (83) encontraron que el porfirinógeno de 7-COOH ~~firi~~porfirinógeno (Figira'gen) era intermediario normal de la reacción, así como San Martín de Viale y Grinstein (84) demuestran que hexaporfirinógeno, (Hexa'gen) III y pentaporfirinógeno III (Penta'gen) son también intermediarios de la reacción. Con el isómero III las decarboxilaciones ocurren en el sentido de las agujas del reloj comen-

zando por el anillo D (85) en cambio con el isómero I que es simétrico son al azar (86). El análisis quiral estableció que en la reacción los protones del C metilénico del Uro'gen III permanecen intactos en el Copro'gen y que la reacción procede con retención de la configuración en el C metilénico de las 4 cadenas de acetilos (87).

4.2- Cinética.

Se ha postulado que la reacción ocurre en dos etapas bien definidas, la primera, es la rápida remoción del primer carboxilo del anillo D del Uro'gen III, para dar Firia'gen III y las segundas la lenta remoción de los otros carboxilos (79, 88-90).

El cuadro de acumulación de intermediarios varía según la serie isomérica y la relación de Uro'gen a enzima así cuando es baja, Copro'gen es el producto principal, si es alta, Firia'gen se acumula (79, 80, 91). San Martín de Viale y col. (75) y Kawanishi y col. (92) informan que cuando Uro'gen III está en alta concentración disminuye el Copro'gen formado pues existe inhibición por producto final. Contrariamente De Verneuil y col. (77) dicen que Copro'gen III no inhibe a la PCL sino que durante la reacción se genera un inhibidor.

Cuando el sustrato es Uro'gen I a bajas concentraciones del mismo el principal producto es Copro'gen I (79); al ir incrementando la concentración del sustrato, los productos Copro'gen I y Penta'gen I igualan sus cantidades (79, 80)

y finalmente se acumulan Firia'gen I y Hexa'gen I (79), Kawanishi y col. (92) no encuentran acumulación de Firia'gen I, Ríos de Molina y col. (80) informan el siguiente orden de velocidades de decarboxilación para la serie isomérica III $7\text{-COOH} < 8\text{-COOH} < 5\text{-COOH} \approx 6\text{-COOH}$, De Verneuil y col. (93) establecen que la velocidad de decarboxilación de Penta'gen III es mayor que la de Uro'gen III y que la de Uro'gen I es menor que la de Uro'gen III y que la de Penta'gen I es menor que la de Penta'gen III. Koopmann y col. (19) sugieren que para la serie isomérica I también existen dos etapas de decarboxilación siendo la etapa limitante la remoción del último-COOH. Respecto a las inhibiciones, De Verneuil y col. (97) encontraron que los porfirinógenos menos carboxilados pueden inhibir las decarboxilaciones de los más carboxilados, pero lo inverso no ocurre, también demuestran que los porfirinógenos de las series I y III con igual número de carboxilos presentan inhibiciones recíprocas. Smith y Francis (94) demuestran que las porfirinas son fuertes inhibidores de la PCL, también determinan que la mayor diferencia de las series isoméricas I y III radica en la primer decarboxilación.

Los valores de Km informados por los distintos grupos de trabajo se presentan en la Tabla I. Según Smith y Francis (76) al aumentar el número de carboxilos del porfirinógeno, aumenta el valor del Km y por lo tanto disminuye la afinidad. Straka y Kushner (91) realizaron los gráficos de doble recíproca para cada sustrato de la enzima, siendo lineales para

TABLA I. Valores de Km informados en la literatura PCL.

Sustrato	Km (μ M)		Fuente enzimática	Referencias
	Serie III	Serie I		
Uro'gen	5	-	reticulocitos de conejo.	72
	1,01	0,9	bazo de ratón	81
	3-5		eritrocitos de aves.	90
	1		hojas de tabaco.	95
	0,5-1,5		hígado de rata.	76
	3,24		hígado de rata.	80
	0,46	1	hígado bovino.	91
	0,35	0,8	eritrocitos humanos.	93, 96
		1,33	eritrocitos humanos.	97
	Firia'gen	1,3		eritrocitos de aves.
0,5-1,5			hígado de rata.	76
0,72			hígado de rata.	80
0,24		0,59	hígado de bovino.	91
Hexa'gen	0,5-1,5		hígado de rata.	76
	1,43		hígado de rata.	80
	1,2	0,80	hígado de bovino.	91
Penta'gen	8,1		hígado de rata.	76
	1,43		hígado de rata.	80
	0,81	0,85	hígado de bovino.	91
	0,05	0,07	eritrocitos humanos.	93, 96
		0,57	eritrocitos humanos.	97

Uro'gen III, Firia'gen III y Penta'gen I y bi fásico para el resto de los sustratos. Determinan para estos últimos, los valores de K_m a concentraciones de sustrato mayores y menores que $5 \mu\text{M}$ encontrando que a las concentraciones menores, K_m está en un rango de $0,42-0,79 \mu\text{M}$ y a las concentraciones de sustrato superiores, está entre $1,7$ y $5,2 \mu\text{M}$ y de los gráficos de Hill calculan al n aparente en un rango de $0,72$ a $1,20$.

4.3- Características generales.

Se ha demostrado que la enzima, proveniente de diversas fuentes, no necesita cofactores (87, 92, 96, 98) que no contiene metales (72, 92, 99), que el O_2 inhibe su actividad (72, 83, 90, 95, 99), salvo Koopmann y col. (79) quien no encontró efecto del O_2 en la actividad PCL de *Rhodospseudomonas palustris*; los metales que inactivan grupos sulfhidrilos también inhiben a la PCL (93, 96, 99), algunas sales también disminuyen la actividad enzimática (83, 89, 95, 30). Respecto al efecto del hierro "in vitro" el panorama no es muy claro, algunos autores no encuentran efecto de este metal en la actividad PCL (96, 100, 101) otros encuentran inhibición (82, 91, 98, 99, 102, 103) incluso se ha informado que produce activación (104).

4.4- Purificación.

La actividad PCL fué purificada de diversas fuentes según puede verse en la Tabla II.

TABLA II. PURIFICACION DE PCL. DATOS DE LITERATURA.

Fuente	Cita Purificación (veces)	Rendimiento %	Actividad (Unidad enzimática)	PM	Método	Estructura cuaternaria	PI	pH op.	Sustratos ensayados	Métodos de purificación	Observaciones
Retículo de conejo.	72	--	---	--	--	--	--	6,8	Uro'gen III	Lisado. Centrifugaciones. Electroforesis zonal en gel de almidón.	--
Rodopseudomonas spheroides.	105	--	7,7 μ g Copro'gen / h mg	--	--	--	--	--	P8G+P8G-D	Usado. Polvo-cetónico, fraccionamiento salino $SO_4(NH_4)_2$ 35-45%.	--
Eritrocitos de pollo	88 y 89	24	78 μ mol Uro'gen / h mg	--	--	--	--	--	Uro'gen III	Lisado. Centrifugación. DEAE-celulosa, fraccionamiento salino $SO_4(NH_4)_2$ 40-75%, DEAE	--
Bazo de ratón	81	8,5	22 UE/mg 1 UE = 1 nmol Copro'gen / ml h	--	--	--	--	--	Uro'gen I Uro'gen III	Homogeneización. Centrifugación. Acidificación pH 5.5. Fraccionamiento, $SO_4(NH_4)_2$ 35-45% Sephadex G150	--
Hojas de tabaco	95	17	9936 UE/mg 1 UE = 1 nmol Copro'gen / 90 min	--	--	--	--	6,5	Uro'gen III	Homogeneización. Centrifugación. Fraccionamiento salino $SO_4(NH_4)_2$ 50-60% Adsorción en gel de fosfato.	--

TABLA II. PURIFICACION DE PCL. DATOS DE LITERATURA . (continuación).

Fuente	Cita	Purificación (veces)	Rendimiento %	Actividad (Unidad enzimática)	PM	Método	Estructura cuaternaria	PI	pH op.	Sustratos ensayados	Métodos de purificación.	Observaciones
Eritrocitos humanos.	107	4419	3	58,3nmol Copro III min mg prot. 58000	39500	SDS/PAGE Sephacryl S200.	--	4,6	--	Penta'gen III	Lisado. DEAE. SO ₄ (NH ₄) ₂ 40-65% Sephacryl S200. Phenyl Sepharose.	--
Hígado de rata	108	100	5	38,88nmol Uro'gen mg prot. 30'	41000	Sephadex G100.	--	--	6,8	Uro'gen III	Homogeneización. Centrifugación. SO ₄ (NH ₄) ₂ 35-70% Gel de fósforo. DEAE. Sephadex G100.	--
Eritrocitos humanos.	109	--	--	42000 Unidades mg prot.	42000	SDS/PAGE	--	--	--	--	Lisado. Centrifugación. DE 52. SO ₄ (NH ₄) ₂ 20-45% Phenylsepharosa	Secuencian 367 aa por mol de aa enzima(10% de aa aromáticos,conjunto de 6 cisteína
Rodopseudomonas palustris.	79	16	50	Formación de Copro 93,03 UE mg prot. Decarboxilación de Uro'gen 169,24 UE mg prot.	46000	Sephadex G100	Monómero	--	6,9	Uro'gen I gen III. 6,8 Uro' gen I.	Homogeneización. Centrifugación. Calentamiento. SO ₄ (NH ₄) ₂ 45-75% Sephadex G100.	--

TABLA II. PURIFICACION DE PCL. DATOS DE LITERATURA. (continuación).

Fuente	Cita	Purificación (veces)	Rendimiento %	Actividad (Unidad enzimática)	PM	Método	Estructura cuaternaria	PI	pH op.	Sustratos ensayados	Métodos de purificación.	Observaciones
Eritrocitos humanos.	106	500	11	--	--	--	--	--	--	Penta' gen III Uro' gen III	Lisado. Centrifugación. DEAE. Sephadex G200 SO ₄ (NH ₄) ₂	--
Hígado bovino.	91	693	5	936 nmol Uro'gen I h mg	57000	Sephadex G150 Sephacryl S200 SDS/PAGE	Monómero	4,6	6,8	Uro'gen I	Homomeización Centrifugación. Acidificación SO ₄ (NH ₄) ₂ 27-50% DEAE Phenyl Sepharosa Hydroxapatita Sephacryl S-200	--
Eritrocitos humanos.	93 y 96	2 x 10 ⁴	49	9 970 unidades/mg	Sangre fresca 46000 58000	SDS/PAGE PAGE	Monómero	4,6	6,8	Uro' gen III 6,2 Uro' gen I. 6,8 Pen- ta'gen III 5,4 Pen- ta'gen I	Lisado. Centrifugación. DEAE. Octyl Sepharosa. Phenyl Sepharosa. Hidroxapatita. Sephacryl S-200.	Análisis de aa 10% aa aromáticos 9 cisteínas/mol enzima.
Eritrocitos de pollo.	92	5 x 10 ³	12	1420 UE/mg 1 UE = 1 nmol Coenzima h	79000 39700	Sephadex G150 SDS/PAGE	Dímero	6,2	6,8	--	Lisado Centrifugación. DEAE. SO ₄ (NH ₄) ₂ Sephadex G100. Cromato enfocado.	Análisis de aa 6,6 cisteína/mol enzima.

TABLA II. PURIFICACION DE PCL.DATOS DE LITERATURA (continuación).

Fuente	Cita Purificación (veces)	Rendimiento %	Actividad (Unidad enzimática)	PM	Método	Estructura cuaternaria	PI	pH op.	Sustratos ensayados	Métodos de purificación.	Observaciones
Eritrocitos humanos.	110	11 x 10 ³	--	35000	SDS/PAGE	--	--	--	Uro'gen III Lisado. Uro'gen I Firia'gen I	Centrifugación. DEAE S ₀ (NH ₄) ₂ 40-70 %	Las 2 fracciones con distintos PM y Km pueden ser isoenzimas.
				54000						Hidroxapatita Cromatografía de afinidad con Uro I como Ligando.	

4.5- Naturaleza del sitio activo.

Respecto a la naturaleza del sitio activo de la PCL, numerosos grupos avalan que al menos un grupo SH es esencial para la actividad (72, 79, 81, 92, 93, 95, 104) incluso Elder y col. (107) proponen que la presencia de un grupo SH en el sitio activo es consistente con el mecanismo de protonación desprotonación propuesto por Bernard y Aktar (87). Chen y Miller (95) analizando el efecto de iones en la actividad de la PCL sugieren que Cl^- y F^- podrían unirse a un sitio ácido catiónico de la enzima, el cual estaría en o cerca del sitio catalítico de la enzima, la pérdida de este mismo cambiaría el entorno local del sitio activo afectando la actividad PCL. Ríos de Molina y col. (108), analizando el efecto de compuestos fenólicos también sugieren la presencia de algún grupo positivo en el sitio activo de la enzima coincidiendo incluso con Straka y Kushner (91) que avalan que la PCL podría tener residuos positivos, que serían necesarios para la apropiada orientación del sustrato dado que a baja fuerza iónica tiene baja actividad, la cual aumenta con el aumento de la concentración de cationes, y los aniones a altas concentraciones alteran el cuadro de distribución de los productos. Kawanishi y col. (92) sugieren que alguna histidina estaría en o cerca del sitio activo de la PCL dado que es inhibida por dietilpirocarbonato. Koopman y col. (99) sugieren que histidina y cisteína serían parte del sitio activo analizando los puntos de inflexión de las curvas de pH en comparación con los puntos isoelec-

tricos de los aminoácidos, junto con los efectos inhibitorios de 5,5'-diñobis 2-nitrobenzoato y de dietilpirocarbonato.

4.6- Estructura de la enzima.

Muchos grupos de investigación estudiaron si una única proteína es la responsable de catalizar las cuatro decarboxilaciones, de las dos series isoméricas y el número de sitios activos involucrados. Los resultados demuestran que es una única proteína con más de un sitio catalítico. Tomio y col. (89) encuentran igual grado de purificación y rendimiento para las dos etapas de decarboxilación sugieren que están en presencia de una única proteína y por el comportamiento de las decarboxilaciones intermedias, a los distintos agentes, supondrían que tiene al menos dos sitios catalíticos. Por el contrario, Romeo y Le_vin (81) suponen que el sistema enzimático involucrado en la decarboxilación del Uro'gen es igual para ambos isómeros, sin embargo dicen que es posible que más de una enzima esté involucrada, cada una catalizando uno o más de los cuatro pasos de decarboxilación.

San Martín de Viale y col. (75) por estudios cinéticos deducen que una única proteína decarboxila los 4 isómeros de Uro'gen. Elder y Tovey (106) purifican PCL manteniéndose la relación de actividades de Uro'gen III a Penta'gen III. Smith y Francis (76) suponen que el reconocimiento y remoción del carboxilo del acétilo del anillo D del Uro'gen III podría ocurrir en un sitio activo separado o en otra

enzima respecto a las otras decarboxilaciones. De Verneuil y col. (77) copurifican la actividad de la enzima hacia Uro'gen III y Penta'gen III, también encuentran que el defecto enzimático en pacientes con un 50% de disminución de la actividad PCL puede detectarse con cualquier sustrato, lo que avalaría la presencia de una única proteína; los estudios cinéticos por ellos realizados indican que los porfirinógenos más carboxilados no inhiben las decarboxilaciones de los meros carboxilados y los menos carboxilados inhiben competitivamente a los de mayor número de carboxilos sin ser decarboxilados. Suponen por lo tanto cuatro sitios de decarboxilación en una única proteína. En un trabajo posterior (93) determinan que a lo largo de la purificación mantienen la relación de actividades de Uro'gen III a Uro'gen I y de Penta'gen III a Penta'gen I. y por lo tanto las cuatro decarboxilaciones que ocurren desde Uro'gen III y I a Copro'gen III y I son catalizadas por una única enzima, que tendría 2 ó más sitios catalíticos. Straka y Kushner (91) encuentran que todos los sustratos tienen coeficientes de Hill próximos a 1 pero varios porfirinógenos tienen más de un Km, Uro'gen III, Firia'gen III y Penta'gen I que tienen un solo Km, se unirían a único sitio, los otros podrían ocupar más de un sitio, al menos dos, uno de alta y otro de baja afinidad. Sassa y col. (96) copurifican juntas las actividades para Penta'gen I y III y Uro'gen I y III, suponen una única proteína. Elder y Tovey (107) encuentran que la actividad para Uro'gen III y I disminuye con

la purificación pero no para Penta'gen III. Por inmunoensayos determinan que toda la actividad reside en una única proteína y que la especificidad cambia durante la purificación, sugieren que existiría más de un sitio activo dado que el lugar para la decarboxilación del Uro'gen es más susceptible a la inactivación tal vez por oxidación durante la purificación. Koopman y col. (79) también encuentran que la relación de actividades de Uro'gen III a Uro'gen I se mantienen durante la purificación, por lo tanto sugieren una única proteína, Ríos de Molina y col. (80) por datos cinéticos avalan también que las decarboxilaciones de Uro'gen III y I así como la de los intermediarios ocurren en una única proteína: hipótesis avalada por el efecto del hexaclorobenceno (HCB) sobre PCL. Así la formación de Copro'gen esta inhibida en ratas intoxicadas por HCB en igual grado ya sea que se mida con los porfirinógenos de 8-, 7-, 6-, ó 5-COOH.

4.7- Estudios genéticos. Regulación.

De Verneuil y col. (111) determinaron que el gen que codifica para la PCL está en el cromosoma 1 humano, desarrollando un inmunoensayo para detectar la PCL y lo aplicaron para localizar la enzima humana en células somáticas híbridas de humanos y roedores. Dado que ALA-D, PBG-D y Coprogenasa están asignados a los cromosomas 9, 11 y 9 respectivamente (112, 69, 113) y que en células eucariotas las enzimas funcionalmente asociadas no necesariamente están agrupadas en el genoma o no están en el mismo cromosoma, y que

existe inducción secuencial de las enzimas durante la diferenciación eritroide, suponen que la exposición coordinada de las mismas debe tener, más relación con genes control que con genes estructurales del camino.

Romeo y col. (114) clonaron e identificaron una secuencia de DNA que hibridiza con mRNA que codifica para PCL de rata y humano, el largo del mRNA es de 1.500 nucleótidos, lo cual es compatible con un PM de 40.000 Da para la enzima, en un trabajo posterior Grandchamp y col. (115) sintetizaron PCL "in vitro" en un sistema libre de células de lisado de reticulocitos bajo la dirección de mRNAs de hígado fetal y reticulocitos humanos, encuentran que la enzima se sintetiza con el PM de la proteína madura (43.000 Da), cuando usan el mRNA fetal la PCL representa el 0.04% de las proteínas sintetizadas y el 0.005% con el mRNA de reticulocitos, por lo tanto suponen que las enzimas de la biosíntesis de hemo se inducen en los pasos tempranos de la eritropoyésis y que los mRNAs correspondientes se desestabilizan antes del estado de reticulocitos.

Grandchamp y col. (116) estudian durante la diferenciación inducida por dimetilsulfoxido en células de ratones eritroleucémicos la expresión genética de PBG-D y PCL encontrando para la PBG-D dos formas una de 44KD no eritroide y la otra de 42 KD eritroide, que estarían codificadas por mRNA distintos pero que serían expresión de un mismo gen, durante la diferenciación sólo aumenta la de 42 KD. Se inducen durante la diferenciación los mRNAs para PCL Y

PBG-D, ocurriendo este evento temprano en el proceso de diferenciación y precediendo a la acumulación de mRNA para las α y β globinas. En la misma línea Romeo y col. (66) aislan clones cDNA complementarios al mRNA que codifica para las dos enzimas PBG-D y PCL y estudian las cantidades relativas de los mensajeros correspondientes presentes en varios tejidos y líneas celulares, encuentran que cada enzima está presente como una única copia en el genome humano, siendo los cromosomas 11 y 1 los loci para PBG-D y PCL respectivamente. Para PCL mapean el locus y lo encuentran en la banda 1 p 34 del brazo corto del cromosoma 1. Encuentran un único tamaño de mRNA para cada enzima (1.800 bases y 1.400 bases para PBG-D y PCL respectivamente) el mRNA para PCL fue siempre elevado para tejido eritroide o líneas celulares en cambio para PBG-D está afectado por la naturaleza del tejido eritroide y la proliferación celular. Por lo tanto estarían las dos enzimas reguladas diferencialmente a nivel pre-transduccional. Posteriormente (109) clonan y secuencian el cDNA que codifica para PCL humana, hallan una secuencia de 367 aminoácidos observan que el gen está presente como una única copia, que existe una única especie de mRNA, en tamaño, en tejidos eritroides y no eritroides, y que el nivel de mRNA está aumentado en células de origen eritroide dada la activación transcripcional específica del tejido para el gen de PCL. Sugieren para la regulación i) que el gen tuviera un promotor simple, la eficiencia del mismo estaría aumentada de manera específica del tejido, o ii) que existan dos promotores uno

común en todos los tejidos y el otro activo solamente en tejido eritroideo.

Romano y col. (117) estudiaron la estructura del gen para PCL humana, encuentran que está compuesto por 10 exones sobre un DNA de 3 Kb, tiene dos puntos de inicio de transcripción uno mayor que el otro, separados por 6 bases. Secuencian a una distancia de 900 pares de bases de los sitios de iniciación encontrando módulos, 1) un pseudo TATA box (característica de genes "house keeping") y 2) un único Sp1 box (CG box sitio de unión del factor Sp1 que activa la transcripción en genes eucariotes) ambos módulos están a 70 pares de bases de distancia arriba del sitio de iniciación, lo que sugiere una simple organización del promotor. Este gen es funcional y sensitivo al "enhancer" SV 40 que es una característica no común a los genes "house keeping". Los autores deducen que se transcribe el gen en una única especie de mRNA, concluyen que el gen se expresa en una manera constitutiva y específica de tejido a través del uso de un único promotor y mRNA, por medio de una transcripción incrementada. Asumiendo que la frecuencia de iniciación y el bloque de elongación gobierna la cantidad de transcripto primario, plantean dos hipótesis: 1) existe un punto de terminación en la elongación del transcripto dentro del primer intron en tejidos no eritroideos que se suprime durante la diferenciación eritroide y 2) existe un "enhancer" específico de tejido en el promotor.

Romeo y col. (118) encuentran que la secuencia de

cDNA de humanos tiene 85% de homología en nucleótidos y 90% de homología en aa con la de rata.

En línea general estos autores (109) avalarían la hipótesis que los genes que codifican para las enzimas del camino metabólico del hemo serían un modelo de genes "house-keeping".

5- Coproporfirinógeno oxidasa.

Coproporfirinógeno oxidasa (coprogenasa) (EC 1.3.3 3.) es una enzima mitocondrial que convierte Copro'gen III en Proto'gen IX en un proceso donde los sustituyentes propiónicos de los anillos A y B son decarboxilados a vinilos. Puede usar como sustratos Copro'gen III y IV (40) (Fig. 8).

La enzima proveniente de mamíferos posee un requerimiento absoluto de O_2 (119) que sería, el oxidante de la reacción. En contraste con la enzima de mamíferos, aves y plantas que necesitan O_2 , los microorganismos que crecen en condiciones anaeróbicas estrictas utilizan un aceptor de electrones distinto del oxígeno probablemente 5-adenosil metionina (120).

Fue postulada la formación de un intermediario de reacción, el 2,4-Bis (β hidroxipropiónico) deuteroporfirinógeno IX (121) y que la formación de un vinilo de una cadena de β -hidroxipropiónico es más rápido en la posición 2 que en la 4 (119). Fue descrito un harderoporfirinógeno como intermediario de decarboxilación del porfirinógeno hidroxipropiónico a Proto'gen (122) (Fig. 8).

Respecto a la estereoquímica se ha postulado que el

Fig 8 REACCION CATALIZADA POR COPROPORFIRINOGENO-
OXIDASA

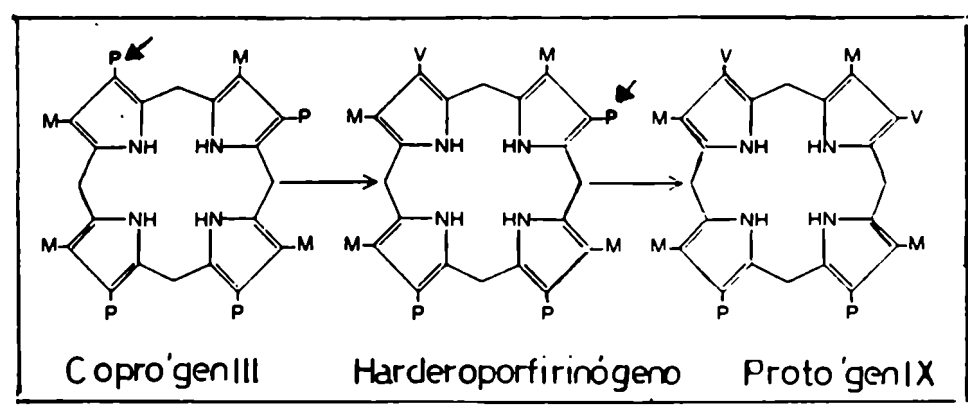
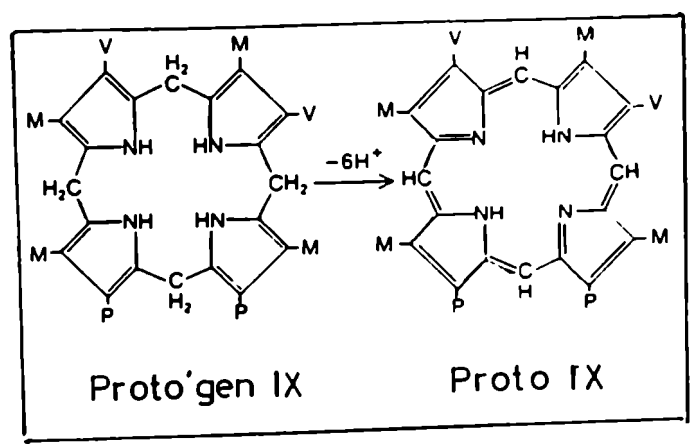


Fig. 9 REACCION CATALIZADA POR PROTOPORFIRINOGENO-
OXIDASA



átomo de hidrógeno en posición β con la configuración pro S es eliminado y que toda la reacción procede con un mecanismo antiplanar (123).

La enzima de hígado de rata fué localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria con un 20% asociado a la membrana interna mitocondrial (124, 125). En levaduras fué localizada en el citosol (126).

La enzima de mamíferos tiene un PM entre 71.600-80.000 y un Km entre 30-48 μ M (119, 127). En levaduras se obtuvo PM de 70.000 y 35.000 sugiriendo que es dimérica y un Km 50 μ M (126).

6- Protoporfirinogeno oxidasa.

Protoporfirinógeno oxidasa cataliza la oxidación de Proto'gen IX a Proto IX. Fué identificada en levaduras, *Escherichia coli*, hígado de rata y bovino, eritrocitos, leucocitos y fibroblastos humanos (40). En mamíferos el PM reportado fue de 35.000, en levaduras 180.000, el Km fue de 11 μ M y 4.8 μ M para hígado de rata y levaduras respectivamente. (Fig. 9).

La enzima no oxida Uro'gen I, Copro'gen I ó III (40).

Proto'gen-oxidasa fué localizada en la membrana interna mitocondrial anclada en la bicapa lipídica y se supone que el acceso del sustrato al centro catalítico de la enzima no implica un mecanismo activo y que el acceso es el mismo de ambos lados de la membrana (128).

7- Ferroquelatasa.

Ferroquelatasa o Protohemo-ferroliasa (E.C. 4.99.11.)

cataliza la inserción de hierro en protoporfirina IX. La actividad de esta enzima ha sido demostrada en una variedad de tejidos y especies en células procariotas y eucariotas (129, 130, 131, 132). En células eucariotas ha sido localizado en la membrana interna del lado de la matriz pero sumergido en la bicapa, de manera tal que el sitio activo está localizado del lado de la matriz (133, 134). En procariotes está unido a la membrana citoplasmática (135).

En hígado bovino se ha propuesto un mecanismo secuencial 8i8i donde primero se tiene el Fe^{2+} y luego la porfirina y se liberaría primero el hemo y luego los dos protones (136) (Fig. 18).

Se ha reportado que dos grupos -SH unirían al Fe^{2+} , estos grupos estarían en un entorno hidrofóbico pero accesible a moléculas pequeñas cargadas y el aminoácido arginina sería parcialmente responsable de unir a la protoporfirina (137). Dailey (138) por técnicas espectrofluorimétricas examinó el sitio activo de la enzima de hígado bovino y propone un modelo donde el sitio activo es un bolsillo hidrofóbico similar al encontrado en hemoproteínas.

La enzima ha sido purificada de varias fuentes, existe cierta discrepancia en los PM informados que podrían explicarse por la tendencia de la enzima a formar agregados, para la enzima desnaturalizada se obtuvieron PM de aproximadamente 40.000 y para la nativa desde 63.000 a 290.000 Da.

La actividad ferroquelatasa puede medirse con sustratos

Fig.10 REACCION CATALIZADA POR FERROQUELATASA

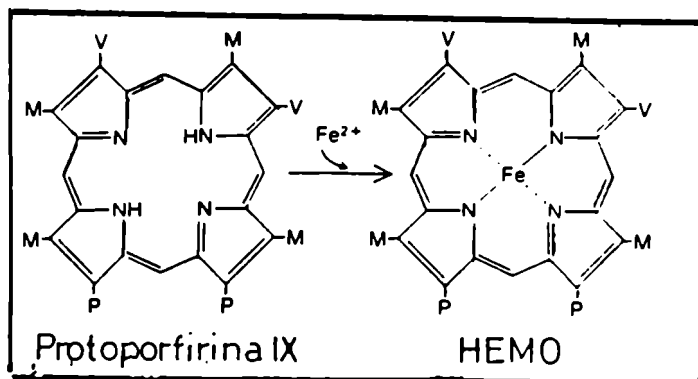
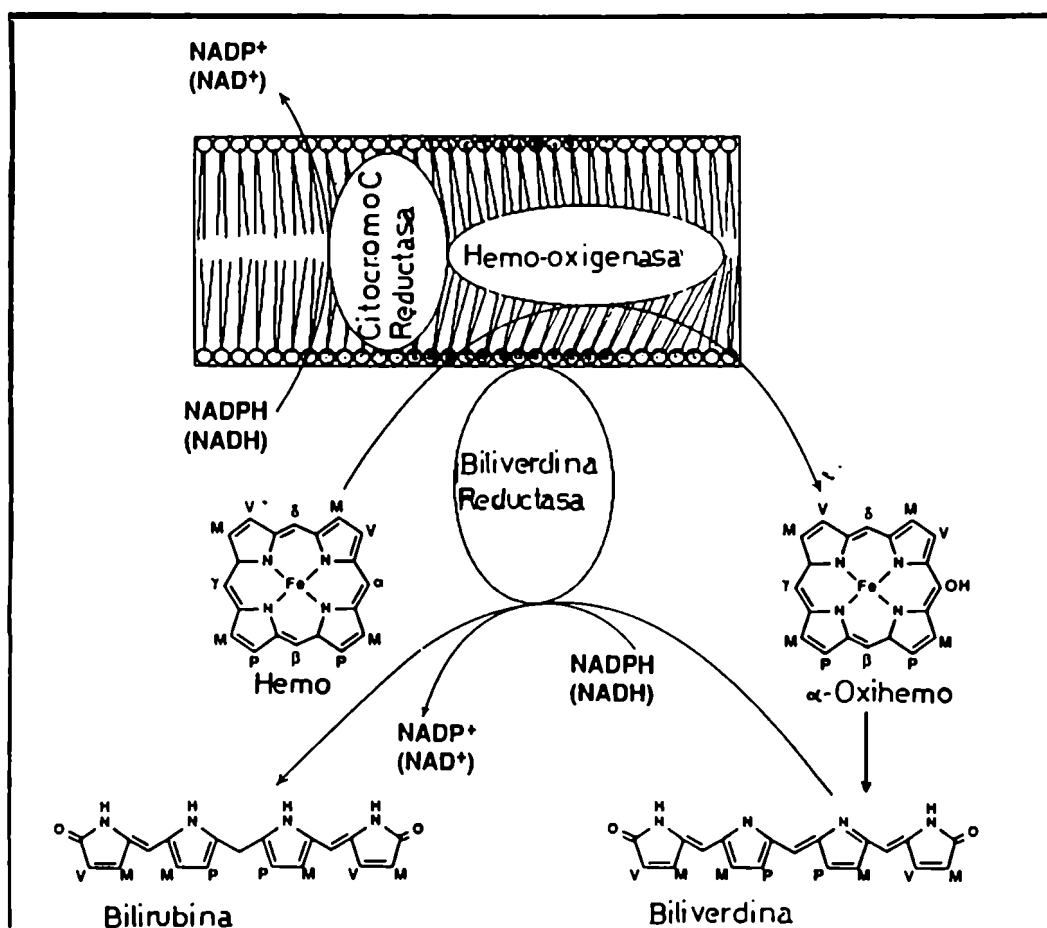


Fig.11 REACCION CATALIZADA POR HEMO-OXIGENASA



distintos de los naturales, Zn^{2+} , Co^{2+} mesoporfirina, deuteroporfirina. Siendo incluso mejores sustratos que los fisiológicos (40, 130, 140). Aparentemente una sola proteína cataliza la inserción de Fe^{2+} y Co^{2+} en mesoporfirina (141) en hígado de cerdo. Los valores de Km informados para Proto van de 11 a 28.5 μM y para Fe^{2+} de 23.3 μM a 80 μM , para mesoporfirina de 27 a 51 μM para deuteroporfirina de 47 a 80 μM , para Co^{2+} 27 μM (40, 136, 141).

DDC, 3- 2-(2,4,6-trimetilfenil)-tioetil -4-metilsilicona (TTMS) y 2,4-dietil-2 metil-1,2 dihidroquinolina (DMDQ) deben su acción porfirinogénica a un mecanismo basado en la inactivación del citocromo P-450, formación N-alquilprotoporfirina (pigmentos verdes) e. inhibición de ferroquelatasa (32).

8- Degradación del Hemo.

La hemooxigenasa cataliza la degradación del hemo a biliverdina que por la biliverdina reductasa rinde bilirubina. En el curso de la degradación oxidativa para formar la cadena tetrapirrólica abierta, se utilizan tres moléculas de O_2 y seis equivalentes de reducción (provenientes de NADPH o NADH), que sirven para mantener al Fe del hemo en forma reducida para que pueda unir el O_2 . El primer producto obtenido es el α -hidroxihemo, que luego es reducido para posteriormente liberar el carbono del α meteno como CO y el ion metálico formandose la biliverdina (142) Fig. 11.

Esta enzima se encuentra en retículo endoplásmico liso, y se ha detectado su actividad en todos los tejidos,

en animales superiores y en formas primitivas de vida (143, 144). La biliverdina reductasa es citosólica y solo el α -isómero es sustrato de la enzima. Para ser sustrato de la hemooxigenasa es necesaria la presencia de las cadenas laterales de propiónicos vecinales en los carbonos 7 y 9 y no tiene especificidad por el ion metálico quelado (143, 144).

Hemooxigenasa fué purificada a homogeneidad de hígado de rata y bazo bovino y de cerdo con PM mínimo de 32.000 Da (145, 146, 147). El análisis de la secuencia nucleotídica del cDNA de humanos permitió deducir que esta formada por 288 aminoácidos con un PM de 32.800 Da . La homología con la enzima de ratas fué del 80% y como en ratas, tiene un segmento de membrana en el carboxilo terminal (148).

Hemo induce la síntesis de novo de la proteína enzimática. Los metales tienen capacidad también para inducir la hemooxigenasa, Co, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Au, Hg, Pb, Cd, Sn, Pt y Sb (142). Otros inductores reportados son: complejos organometálicos, hemocompuestos agentes terapéuticos, solventes orgánicos, toxinas bacterianas, agentes alquilantes, hidrocarburos halogenados (143). Como inhibidores se identificaron las metaloporfirinas (142).

Se han caracterizado dos formas constitutivas de hemooxigenasa microsomal de rata, la HO-1 que es la forma inducible y la HO-2, no inducible; la relación de ambas en el hígado de ratas no inducidas es 1:2, con Co^{2+} la HO-1 incrementa 100 veces, antigenicamente son distintas, no exhi-

ben diferente especificidad con los distintos sustratos, salvo con el citocromo P-420 c. Se tienen evidencias que las dos isoformas no son particulares de rata sino que también existen en conejos y humanos. Se supone que estas enzimas representarían productos translacionales de dos locus genómicos, que son isoenzimas y que una forma no deriva de la otra (143).

La hemoxigenasa se sintetiza en polirribosomas libres pasa al retículo endoplásmico rugoso y luego migra al liso. Los inductores producirían la síntesis de novo de la enzima regulando a nivel transcripcional (142). También se ha sugerido control a nivel translacional por metales (149).

Se ha aislado (150) la secuencia nucleotídica del gen de HO-1 de rata, de 6.830 nucleótidos. Se encontró que está formado por 4 intrones, 5 exones y la presencia de múltiples promotores, que podrían explicar la estimulación de la síntesis por una variedad de factores. La transcripción del gen puede ser regulada no sólo por la secuencia de DNA que une inductores, sino también por factores que repriman la transcripción y lo que explicaría la no inducibilidad de HO-2. Por lo tanto el gen de HO-2 tendría factores que reprimen la transcripción y bloquean la unión de inductores (143). Por otro lado se ha reportado (151) que el gen de HO-1 contiene elementos "heat shock" en la región 5' y el rápido incremento de HO-1 por los distintos estímulos podría reflejar la activación del "pool" de mRNA preexistente como en el caso de las proteínas "heat shock" (143). Sin

embargo recientemente se ha demostrado que el tratamiento por calor no tuvo efecto en la actividad hemooxigenasa ni en los niveles de mRNA trabajando con una línea celular humana (148).

PORFIRIAS.

Las porfirias son enfermedades heredadas o adquiridas, que se producen por defecto en las enzimas del camino biosintético del hemo. Se clasifican como hepáticas o eritropoyéticas según el origen del principal sitio de expresión del defecto genético en cada enfermedad. En todas las formas heredadas de la porfiria humana los factores ambientales juegan un rol fundamental en determinar la expresión clínica de la anomalía genética (40, 152, 155, 156).

1. Porfiria congénita eritropoyética.

Se transmite en forma autosómica recesiva, es una forma muy rara, hay sobreproducción de porfirinas de la serie isomérica I, el defecto genético es la deficiencia en Uro'gen III cosintetasa (40, 154). Presenta fotosensibilidad cutánea muy severa y hemólisis. Uro I y Copro I están incrementados en eritrocitos y en orina, y Copro I en heces (40).

2. Protoporfiria eritropoyética.

Es una enfermedad autosómica dominante, el defecto

genético está en la ferroquelatasa, se encuentra un exceso de Proto en células eritroides, plasma, bilis y heces (40, 154) presenta fotosensibilidad moderada. La expresión genética a nivel clínico, es altamente variable, existen muchos portadores del defecto genético sin manifestaciones clínicas (40).

3. Porfiria aguda intermitente.

Se hereda en forma autosómica dominante, el defecto enzimático está en la PBG-D que está disminuida un 50% en todos los tejidos examinados (154). La sobreproducción de porfirinas es menor y por lo tanto no hay fotosensibilidad. Es latente antes de la pubertad, la expresión clínica luego es altamente variable a pesar de que la deficiencia enzimática es la misma para los casos latentes y los clínicamente expresados. Es más frecuente en mujeres, los factores hormonales, nutricionales y drogas predisponen para la expresión total de la enfermedad quizás por inducción de la ALA-S. Los síntomas son neurovisceral, y podrían deberse a los efectos farmacológicos de los precursores de las porfirinas en tejido nervioso. Presenta una elevada excreción de ALA y PBG en orina (40).

4. Coproporfiria hereditaria.

Se hereda en forma autosómica dominante, el defecto enzimático es un 50% de disminución de la coprogenasa (40, 154) los síntomas son neurovisceral, hay sobreproducción de Copro III y excreción de Copro y precursores ALA y PBG en orina, durante los ataques agudos de la enfermedad así

como también Copro III en heces. Copro III se acumula en el hígado, las porfirinas oxidadas también se encuentran en el plasma y piel que dan cuenta de la fotosensibilidad de algunos pacientes (40).

5. Porfiria variegata.

Es una enfermedad autosómica dominante. El defecto genético básico se cree que sea una deficiencia en Proto' gen oxidasa (40, 154, 153) y un defecto en ferroquelatasa (40) que sería diferente del encontrado en protoporfiria eritropoyético, es influenciada su expresión por hormonas, drogas y factores metabólicos (40).

Presenta síntomas neurovisceral, fotosensibilidad por acumulación de porfirinas en plasma y piel, la excreción de ALA, PBG y Copro III están aumentadas en orina y de Copro III también en heces (40).

6. Porfiria cutánea tarda.

Es la forma más común de las porfirias que comienza en la edad adulta, presenta severa fotosensibilidad; alcohol, estrógenos y siderosis hepática son factores que predisponen al desencadenamiento de la enfermedad.

Los pacientes con PCT tienen un riesgo elevado de desarrollar carcinomas hepatocelulares. Una deficiencia en PCL es la característica de esta enfermedad, presenta una elevada excreción de Uro y Firia en orina y de Isocopro en heces (40).

Se han descrito tres clases de PCT, una familiar en

la cual el defecto enzimático se manifiesta en hígado y eritrocitos con un 50% de disminución de la actividad enzimática, se hereda en forma autosómica dominante (40), se ha informado que personas con porfiria hepatoeritropoyética son homocigotas para el defecto en PCT encontrado en la porfiria familiar presentando una disminución de la actividad PCL del 95% (155). Así la PCT familiar aparenta ser la segunda porfiria genética en humanos que parece presentarse en forma heterocigota y homocigota (40). Los rasgos distintivos respecto de PCT familiar de esta porfiria son el incremento de Zn-Proto en eritrocitos, Penta en orina y Uro en heces y que se presenta en edad temprana (155).

La segunda clase de PCT es la esporádica donde el defecto enzimático se manifiesta sólo en hígado y si bien usualmente no hay antecedentes familiares, se han reportado casos de familias con más de un miembro afectado (40). Se ha sospechado de una predisposición genética para adquirir este tipo de porfiria; así como también asociación con el locus HLA, pero aún no se ha establecido un defecto heredado en PCL en los casos de PCT esporádica (40). En general este tipo de porfiria está asociada a factores desencadenantes como alcohol y estrógenos. Elder y col. (156) recientemente reportan que el tratamiento por flebotomía de PCT esporádica permite una reversión del defecto bioquímico, al menos en algunos pacientes. Un tercer tipo la PCT tóxica abarcaría los casos debidos a exposición a hidrocarburos aromáticos polihalogenados, donde se produce disminución de

PCL de hígado presentando un cuadro similar a la esporádica, o sea no se afecta la PCL eritrocitaria (40, 96).

Recientemente se han realizado varios trabajos tendientes a elucidar el origen del defecto enzimático en PCT. Sassa y col. (96, 157) por "Rocket" inmunolectroforesis determinaron que la cantidad de enzima PCL inmunoreactiva era proporcional a la actividad enzimática, aplican esta técnica a pacientes normales, con PCT familiar y esporádica llaman CRM(+) ó CRIM(+) cuando la muestra obtenida del paciente presenta proteína inmunoreactiva, no activa desde el punto de vista enzimático o sea que el cociente proteína inmunoreactiva a actividad enzimática es mayor que en los normales y CRM (-) o CRIM(-) cuando es igual a los normales.

Los PCT familiar y esporádica dan CRM (-) sólo los que tienen porfiria hepatoeritropoyética donde el defecto en PCT es homocigota da CRM (+), aunque se han reportado casos en que dan CRM (-) (158).

De Verneuil y col (159) en un estudio de una familia con porfiria hepatoeritropoyética, demuestran que el defecto enzimático resultó en una rápida degradación de la proteína PCL "in vivo". El clonado y secuenciación de un DNA complementario para el gen mutado reveló una mutación en la posición 281 donde una glicina es reemplazada por un glutámico (159). Encuentran (158) en este tipo de porfiria una gran heterogeneidad a nivel protéico, la vida media de PCL normal es de 80 hs., en un paciente el recambio es más rápido

de 12 a 10 veces, y en otro 2 veces más; suponen para el primero que la mutación rinde una proteína más susceptible a proteólisis y en el otro coincide con que la PCL tiene mayor PM, por lo tanto podría existir cambio o ineercción de varios aminoácidos tal que varíe la migración proteica. Otro paciente tiene una síntesis de PCL disminuída y una degradación aumentada (160).

Mukerji y Pimstone (97) estudian la cinética de la enzima purificada de eritrocitos de pacientes normales con PCT familiar y esporádica, encuentran que en PCT familiar el Km es de 3.8 a 4 veces mayor usando Uro'gen I o Penta'gen I como sustratos y la Vmax está un 70% disminuída, también fué más estable al calentamiento. Sugieren que dada la ausencia de material inmunológico de reacción cruzada no catalítico CRIM (-) en PCT familiar, la mutación debe haber alterado la conformación enzimática tal que su sitio antigénico no fué reconocido por el anticuerpo anti PCL o que una mutación puntual en el gen estructural podría permitir una menor afinidad de la enzima por su sustrato.

6.1- Porfiria cutánea tarda, modelo experimental. Porfiria inducida por hidrocarburos aromáticos polihalogenados.

Entre los años 1955 y 1959, en el sudeste de Turquía mucha gente ingirió hexaclorobenceno (HCB) a través de trigo contaminado. Como consecuencia de ello adquirió una porfiria semejante a la PCT con los mismos rasgos clínicos y bioquímicos (161, 162).

Ockner y Schmid (163) fueron los primeros en producir porfiria por HCB en ratas, posteriormente se reprodujo en conejos, cobayos (164, 165) y en ratones en presencia de Fe (166) y en aves (167).

La porfiria por HCB en ratas se caracteriza por: fotosensibilidad cutánea (164), elevada excreción de porfirinas (164, 168), algunas veces también se encuentran precursores en orina (168), hay acumulación de porfirinas en hígado (163, 164, 168, 169). El estudio de la naturaleza de las porfirinas excretadas reveló que un 50% era Uro y el resto porfirinas de 7 a 4-COOH, esencialmente de la serie isomérica III, en hígado se encontró acumulación masiva de Uro y en menor proporción Firia (168). En bazo y riñón también se encontró acumulación de porfirinas contrariamente en sangre los valores fueron normales (170, 171). La actividad PCL estuvo fuertemente disminuida en hígado afectando las dos etapas de decarboxilación, también en riñón la actividad fué menor, contrariamente en sangre fué normal y en bazo fué superior (170, 171, 172). Si bien se afectan varios tejidos, el hígado es el principal sitio de acción (170, 171). Estudios en función del tiempo de intoxicación con HCB demostraron que las primeras alteraciones que se producen son la marcada disminución de las dos etapas de decarboxilación del Uro'gen III y el incremento de PBG-D. Posteriormente se evidencia el incremento de ALA-S y ferroquelatasa. Finalmente el aumento de ALA-D es el último en presentarse (173).

El establecimiento de porfiria en animales depende de parámetros tales como la cepa y el sexo, en el primer caso tenemos que las ratas Agus son más susceptibles que las Porton Wistar (174, 175) y las Wistar más susceptibles que los CHBBTOM (176) a adquirir porfiria. Las Agus tienen un mayor contenido de Fe no hémico y mayor actividad de etoxiresofurina demetilasa, que avala el mayor contenido de metabolitos del HCB encontrado en hígado y excreta, lo que implica mayor velocidad biotransformación del xenobiótico (174). El desarrollo de porfiria en ratas machos es más lento que en hembras (168, 177). Se ha demostrado que los estrógenos juegan un papel en el desarrollo de la misma (179). Se ha reprotado que existen diferencias en el metabolismo del HCB dependientes del sexo y que el mismo estaría controlado por estrógenos (177, 180). Sin embargo no se ha encontrado diferencias en el contenido total de metabolitos del HCB entre ambos sexos, si bien los hepatocitos de ratas machos presentan mayor unión de radioactividad de HCB ^{14}C a proteínas y mayor porcentaje de metabolitos azufrados (181).

No sólo el HCB puede producir esta porfiria experimental, las dioxinas, los bifenilos polihalogenados y otros hidrocarburos aromáticos polihalogenados producen el mismo modelo en ratas, ratones y cultivo de células. El inductor de porfiria más potente es la tetraclorodibenzo para dioxina (TCDD) (182). El TCDD induce un patrón de enzimas microsomales semejante al 3-metilcolantreno (citocromo P-448= iso-

enzimas del P-450 c y d en ratas y P-450 1 y 3 en ratón) y el HCB es un inductor mixto pues induce enzimas microsomales como el 3-metilcolantreno y como el fenobarbital (isoenzima del citocromo P-450 b en rata) (182, 183). La diferencia con otros inductores del tipo de 3-metilcolantreno es que induce preferencialmente al P-450 d respecto del c (184). El TCDD induce la enzima arilhidrocarbon hidroxilasa (185) mediada por acción de un receptor citoplasmático de alta afinidad, sin embargo el HCB es un débil agonista del mismo (186) a pesar de inducir la isoenzima P₁450 y P₃450 que están reguladas por el locus Ah.

Estos compuestos porfirinogénicos son altamente lipofílicos y de lenta metabolización y se acumulan en tejido graso (182).

El HCB se metaboliza lentamente y se excreta sin metabolizar principalmente en heces (187, 189) Mehendale y col. (187) detectaron en orina de ratas intoxicadas con HCB pentaclorofenol (PCF), pentaclorobenceno (PCB) un isómero del tetraclorobenceno (TCB) y triclorofenol (triCF). Lui y Sweeney (190) encuentran PCF en orina; Koss y col. (189) identificaron PCF, tetraclorohidroquinona (TCH) y pentaclorotiofenol (PCTF) como metabolitos urinarios y PCTF en heces. Koss y col. (191) investigaron la farmacocinética del HCB y sus metabolitos, en ratas que recibieron durante 15 días 60 mg HCB/kg. Encuentran que a las 9 semanas se establece un equilibrio entre la captación y eliminación del HCB y sus metabolitos; 1 g. de hígado contiene 1 μ mol HCB, 50 nmoles

de PCF, 5 nmoles de TCH y 0,1 nmol de PCTF. El HCB se acumula principalmente en grasas, y entre 30 y 60 veces menos en hígado, sistema nervioso central, riñón y sangre, los metabolitos son detectados en hígado y sangre aún después de finalizada la administración del xenobiótico y la eliminación del mismo continúa por varios meses. En intoxicación crónica encuentran que la relación de metabolitos fenólicos a azufrados es de 2,8 a 1 y en experiencias de corta exposición de 1,3 a 1.

En todas las especies animales estudiadas el PCF fué el principal metabolito del HCB dando cuenta del 45% de la cantidad total de metabolitos recuperados en el cuerpo, orina y heces luego de una dosis del HCB (182, 189, 191).

Debets (182) propone el esquema de metabolización que puede verse en la Figura 12 y Koss y col. (192) informaron que pudieron aislar 21 metabolitos urinarios del HCB que estan en la Tabla III.

Debets y col. (193) trabajando en cultivo de células de embrión de pollo, encuentran que el HCB se metaboliza, produce un perfil de acumulación de porfirinas como el de ratas porfíricas, y encuentra unión de radioactividad a proteínas cuando se adiciona C^{14} HCB, que es inhibido por ácido ascórbico o piperonilbutóxido. Incubaciones de HCB con fracciones microsomales producen PCB, PCF y TCH, y el HCB ^{14}C se une covalentemente a proteínas microsomales (194). Se ha informado que la hidroxilación a PCF ocurre vía la isoenzima del citocromo P-450 inducible por fenobarbital

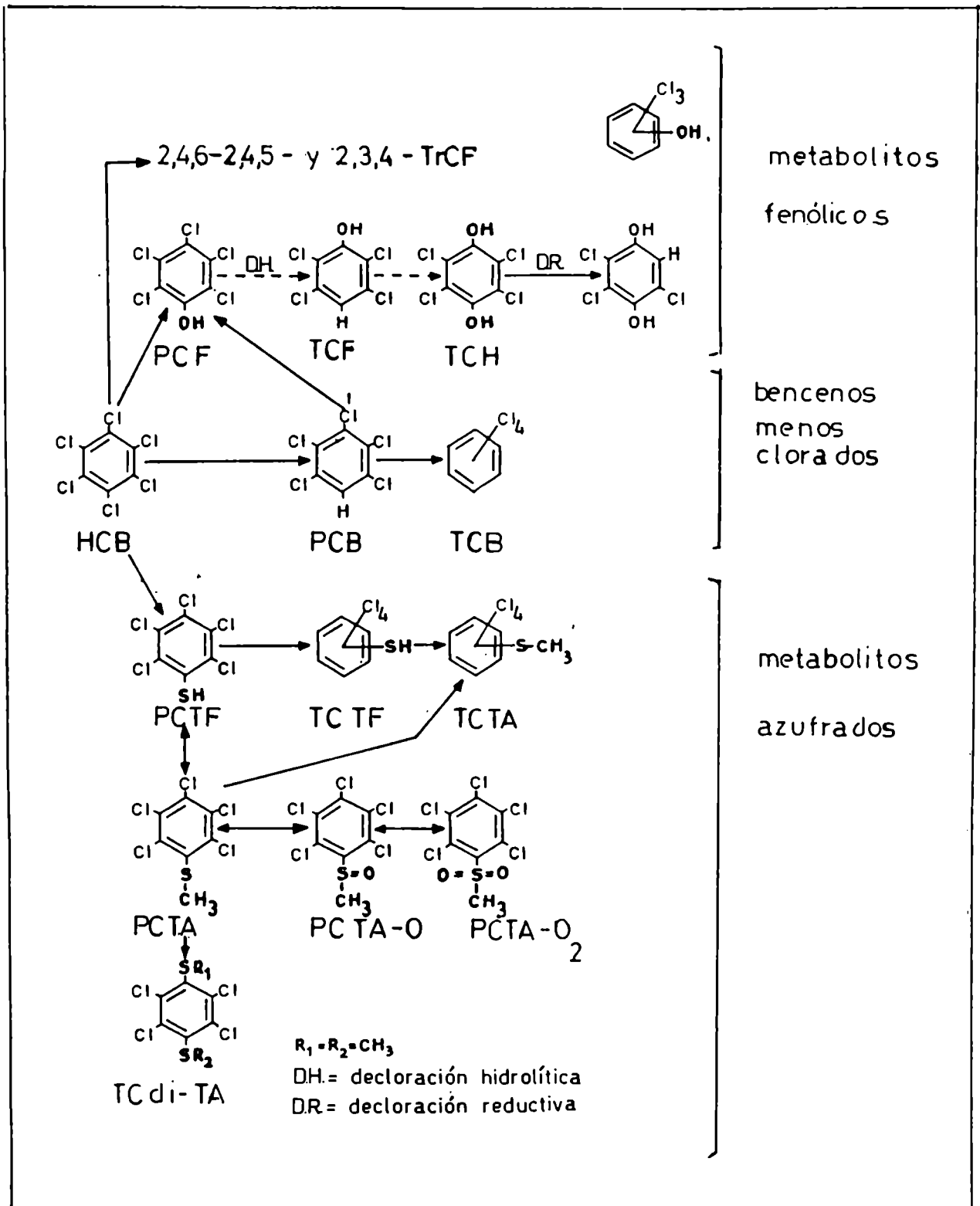


TABLA III. METABOLITOS DEL HCB (192).

pentaclorobenceno (PCB).

2, 3, 4, 6-tetraclorofenol (TCF).

2, 3, 5-tricloro-1, 4- hidroquinona.

2, 3, 4, 5-tetraclorofenol (TCF).

pentaclorofenol (PCF).

tetracloropirocatecol.

tetraclorohidroquinona (TCH).

2, 3, 4, 5-tetraclobrotioanisol (TCTA).

tetraclorometoxitioanisol.

pentaclorotioanisol (PCTA).

1, 4- metoxi- 3-metiomercapto- 2, 3, 6- triclorobenceno.

tetracloro- 1, 4-ditioanisol.

1- metil-(4-metilmercapto-triclorofenil) sulfóxido.

3, 5, 6- tricloro- 1, 2, 4-tritioanisol.

1- metil-(metoxi-tetraclorofenil) sulfóxido.

1- metil-(4 metilmercapto-triclorofenil) sulfona.

1- metil-(metoxi-tetraclorofenil) sulfona.

1- metil-(4-metilmercapto- 2, 3, 5, 6-tetraclorofenil)sulfóxido.

1- metil-(4-metilmercapto- 2, 3, 5, 6-tetraclorofenol)sulfona.

1- metil bis(metilmercapto)-triclorofenil) sulfóxido.

dimetil- (metilmercapto)-(triclorofenil) disulfóxido.

y la subsiguiente; hidroxilación depende de la isoenzima inducible por 3-metilcolantreno, rindiendo TCH y el isómero 1,2 diol-tetraclorobenceno (195). El metabolismo depende de NADPH, O_2 y es inhibido por SKF-525 A, metirapona y CO. Se forma un 88% de PCF, un 9% de TCH y un 2% del isómero 1,2 diol (195).

El FB acelera y exagera los efectos porfirinogénicos del HCB en ratas (173, 196) y la inhibición del metabolismo de drogas o compuestos que atrapan radicales libres protegen contra la acción porfirinogénica de xenobióticos en cultivo de células de embrión de pollo, así como los inductores estimulan la acumulación de porfirinas causada por las mismas (197).

Todos estos hallazgos permitieron afirmar que dado que el HCB "in vitro" no tiene efecto sobre la PCL y que el metabolismo del HCB parece ser un prerequisite para que ejerza su acción, el mecanismo de acción del HCB estaría mediado por algún metabolito. Esta hipótesis fué primero propuesta por Sinclair y Granick (198) sugiriendo que el inhibidor de PCL sería un metabolito de los hidrocarburos aromáticos policlorados de naturaleza fenólica. Sin embargo el PCF principal metabolito del HCB no es porfirinogénico (199, 200, 201) si bien cuando se administra conjuntamente con HCB acelera el establecimiento de porfiria (202). Debets y col. (182) sugieren que los intermediarios tóxicos formados durante la metabolización del HCB y detoxificados por GSH, serían responsables de los disturbios en la síntesis

de hemo basándose en que a) entre los metabolitos del HCB los que contienen azufre podrían provenir de conjugación con GSH o reacción con metionina o por unión covalente de algún intermediario reactivo a grupos SH funcionales de enzimas (PCL), b) Kerkløan y col. (196) encuentran que el dietilmaleato aumenta la acción porfirinogénica del HCB (196) y c) el GSH disminuye los efectos del 1,2,4-tricloro**u**benceno (203).

Contrariamente a estas hipótesis, recientemente Kawaniishi y col. (92) encuentran que PCL purificada de eritrocitos de pollo es inhibida por reactivos de grupos -SH y también es inhibida "in vitro" por una serie de bifenilos policlorados y HCB en presencia de GSH, por tanto estos autores sugieren que actuarían en un sitio de la enzima distinto del activo que contiene SH-.

Una línea de trabajo diferente fué seguida por Elder y Sheppard (204) quienes determinaron que TCDD y HCB causan porfiria en roedores disminuyendo la actividad catalítica de PCL, sin alterar la cantidad de enzima inmunoreactiva.

Molina y col. (108, 205) fueron los primeros en encontrar que hígados de ratas porfíricas por HCB tenían un inhibidor de PCL, no encontrando efecto del HCB "in vitro", más tarde Cantoni y col. (206), lo detectan en ratones tratados con TCDD, encontrando que el inhibidor produce una interacción irreversible en el centro activo de PCL, sugiriendo que "in vivo" también se une covalentemente a PCL,

estos autores no encuentran efecto "in vitro" del TCDD. Smith y Francis (207) informan que ratones tratados con Fe más HCB forman dicho inhibidor pero que Fe o HCB sólo no. También TCDD y bifenilos son capaces de generar dicho inhibidor.

Ríos de Molina y col. (108), purificaron la PCL de hígado de ratas normales e intoxicadas por HCB y analizaron comparativamente las propiedades de las dos enzimas y del comportamiento cromatográfico, los resultados sugieren que existirían diferencias estructurales entre ambas.

6.2- Hierro.

La siderosis hepática es una característica aceptada en PCT (153, 208). El tratamiento por flebotomía de la PCT fué introducido por Ippen (209), y produce la remisión de la mayoría de los pacientes, la idea original fué disminuir los niveles elevados de hemoglobina y quizás canalizar el exceso de producción de intermediarios del camino metabólico del hemo. El concepto aceptado actualmente es que se produce la reducción de Fe en el hígado, que según Kushner y col. (82, 210) es beneficioso en el metabolismo de las porfirinas quizás por la inhibición que produce el Fe sobre la Uro'gen III coesintetasa y PCL. Aunque este último punto, es bastante controvertido (82, 91, 96, 98, 99, 100, 101, 102, 103, y 104). La PCT puede reactivarse por reposición del Fe (211). La desferrioxamina (DF) puede ser efectiva en algunos pacientes (212).

Elder y col. (213) afirman que la sobrecarga de Fe

en ratas no es necesaria para inhibir PCL por HCB, aunque observaciones preliminares implicaban este requerimiento (214). La respuesta de ratones al TCDC puede modularse por el Fe (215) y algunas cepas de ratones, responden pobremente al fungicida si no tienen una predosis de Fe (216). En la porfiria por HCB, la disminución de PCL en ratas es más rápida y se exagera por Fe (217, 218, 219). Si el HCB "per se" incrementa o no el contenido de Fe, tiene respuesta contradictoria entre los distintos grupos de trabajo (218, 219, 220, 221).

Felsher (222) no encontró diferencias en PCL de eritrocitos de pacientes con PCT, no tratados y con flebotomía, sin embargo Elder y col. (223) encuentran que pacientes con PCT esporádica con flebotomía normalizan la actividad PCL.

Respecto al mecanismo de acción del Fe se han propuesto numerosas teorías. En el caso de intoxicación por agentes porfirinogénicos el Fe favorecería el metabolismo del xenobiótico a un metabolito activo responsable del decremento de PCL (103, 198, 220). Mukeiji y col. (102) proponen un efecto dual, a) interacción directa del Fe^{2+} con los -SH esenciales de PCL y b) interacción indirecta debido a que el sistema Fe^{2+}/Fe^{3+} genera O_2^{\cdot} , que por dismutación da H_2O_2 y genera OH^{\cdot} en la reacción de Haber Weiss, entonces los radicales interactúan con PCL y oxidan los porfirinógenos a porfirinas no metabolizables. Esta última hipótesis está avalada por varios grupos de trabajo que involucran al Fe en eventos celulares generadores de especies activas (103, 223, 224).

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S .

MATERIALES.

SUSTRATOS.

ALA fué de Sigma Chemical Co (USA), Uro III de Porphyrin Products, (Logan USA), Glicina Merck.

DROGAS.

HCB para el drogado de ratas fué de grado técnico, suministrado por Cía. Química, S.A. La composición de la droga fué 95% HCB y 5% de tetra y pentaclorobenceno. HCB; pentaclorofenol (PCF); tetraclorohidroquinona (TCH); 1-metil-(2,3,4,5,6-pentaclorofenil)-sulfóxido (PCTA-O); 1 metil-(2,3,4,5,6-pentaclorofenil)-sulfona (PCTA-O₂); pentaclorotioanisol (PCTA); tetraclorotioanisol (TCTA); pentaclorotiofenol (PCTF); 2,3,4,5-; 2,3,4,6-; 2,3,5,6-tetraclorofenol (TCF) 1,2,3,4-; 1,2,3,5-; 1,2,4,5-tetraclorobenceno (TCB); 2,3,4-; 2,3,5-; 2,3,6-; 2,4,5-; 2,4,6-; 3,4,5- triclorofenol (Tr.CF), pentaclorobenceno (PCB). Estas drogas mostraron 99,5 % de pureza por cromatografía gaseosa y fueron cedidas por el Dr. G. Koss (Institut für Toxikologie und Pharmakologie, Philipps-Universität, D-3550, Marburg, Fed. Rep. Germany).

Fenobarbital sódico fué cedido por Laboratorios Bayer, Resina Dowex A.G. 1-X₈, mesh 100-200 forma cloruro o acetato y resina Dowex A.G. 50-X₈, mesh 100-200 forma ión hidrógeno, son fabricados por Dow Chemical Co. y distribuidos por Sigma Chemical Co. USA, Sephadex G-25 fabricado por Pharmacia Fine Chemical Inc. y distribuido por Sigma Chemical, Co USA. Dietilpirocarbonato, 2,3-butanediona, Fenilglicoxal y dimetilsul-

fóxido (DMSO) fueron de Sigma Chemical Co USA.

Las drogas usadas para preparar "buffer" y demás reactivos fueron de grado analítico, marca Carlo Erba, Mallinckrodt ó Merck.

Tween 20 fue gentileza de Importadora Técnico Industrial, desferrioxamina (DF) fue gentileza de Ciba-Geigy Argentina S.A. Solventes: cloroformo C. Erba RPE, FU o Mallinckrodt p.a.; Metanol C. Erba FU, Acetato de etilo y ácido acético glacial p.a. Atanor; dioxano, Lowens o Sintorgan para cromatografía; benceno y eter etílico C. Erba RPE, Kerosene: incoloro, fracción que destila entre 190-240°C.

METODOS.

1. Tratamiento de animales.

1.1. Ratas.

a) Se usaron ratas hembras de la cepa Wistar, de 170 a 200 g. de peso ó CH88THOM. Se alimentaron con una dieta completa standardt "Purina dieta 3" de Cabeza S.C.A. y agua "ad-libitum".

b) El establecimiento de porfiria en ratas se hace mediante el drogado con HCB 40 mg/ml. Para su preparación el HCB se coloca en un mortero y se agrega Tween 20 (0,5 ml/100 ml de H₂O), se mezcla íntimamente la droga con el agente tensioactivo y luego se agrega el agua. El HCB se administra a los animales por sonda gástrica en dosis de 1 g/kg de peso del animal.

El estado de porfiria de los animales se sigue, observando por espectroscopía las bandas de absorción características de las porfirinas presentes en la orina. En algunos experimentos se determina ALA, PBG y porfirinas en la misma

c) Administración de desferrioxamina: se administra por inyección intramuscular 100 mg/kg de peso, tres veces por semana. La droga se disuelve en agua destilada.

1.2. a) Embriones de pollo.

Se utilizaron embriones de pollo de 17 días de la cepa White Leghorn. Se mantienen en cámara húmeda a 37°C.

b) Para inyectar las drogas (225), se marca primero con un lápiz la cámara de aire, con ayuda del ovoscopio, se desinfecta la cáscara con etanol y se hace un orificio pequeño con un punzón que luego se agranda con una tijera cortando un disco de 1 cm. de diámetro, sobre la cámara de aire. Para transparentar la membrana corioalantoica y poder ubicar mejor al embrión, se colocan sobre la misma 2 ó 3 gotas de solución fisiológica estéril. Las drogas se inyectan en los líquidos que rodean al embrión mediante una jeringa de 0,5 ml provista de una aguja descartable estéril de 226 x 1,5 cm. El orificio de la cáscara se sella con cinta durex y se incuba al embrión. Todos estos pasos se realizan en condiciones estériles.

2. Purificación de porfirinógeno carboxi-liasa (PCL) de hígado de ratas.

Se sigue el método reportado por Ríos de Molina (226)

Se sacrifican los animales por decapitación, se extrae el hígado, se lava con solución fisiológica, se homogeneiza en KCl 0,154 M (1 g/5 ml). Se centrifuga a 11.000 xg. Luego se realiza el fraccionamiento salino con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ en el rango 0-35% y 35-70%, este último es el que contiene la actividad enzimática. El precipitado obtenido en la etapa anterior se desala por pasaje a través de columnas de Sephadex G-25 (2,5 x 30 cm) equilibradas con buffer fosfato de potasio 5 mM pH 6.8. Luego se absorbe en gel de fosfato en una relación proteína/gel de 1:2, se trabaja en "batch" y se eluye con "buffer" fosfato de potasio 67 mM pH 6,8. El gel fué preparado según el método de Keilin y Hartree (227).

La PCL eluída se precipita con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ entre 0-75% se guarda a -50°C no más de una semana antes de usarla. Se desala por columnas de Sephadex G-25, equilibrada con el "buffer" que sea necesario para las reacciones de modificación del sitio activo de la enzima.

3. Perfusión de hígado de rata.

Se sacrifica el animal por decapitación y se inyecta solución fisiológica por la vena porta hasta blanquear el hígado. Este tratamiento se realiza para las experiencias de desferrioxamina y de obtención del inhibidor de PCL.

4. Determinación de ALA, PBG y Porphirinas en orina.

4.1. Metodología.

Se utilizaron resinas de intercambio aniónico Dowex

A.G. 1-X₈ 200-400 mesh, en forma acetato y resina de intercambio catiónico Dowex A.G. 50-X₈ 200-400 mesh en forma hidrógeno. Se utilizan columnas de vidrio de 18 cm de largo x 1 cm de diámetro, con aproximadamente 2 ml de resina.

La técnica seguida fué esencialmente la de Mauzerall y Granick (228) ligeramente modificada y detallada por Wainstok de Calmanovici (229).

Si la orina se encuentra a pH básico se ajusta a pH 4 con ClH concentrado, se mezcla para disolver los fosfatos presentes y se reajusta a pH 6 con AcONa saturado. Se siembra 1 ml de orina (o menos en el caso de orina proveniente de animales muy porfíricos) en la columna aniónica, se lava con agua destilada, se recoge todo en un tubo que contiene el ALA que no es retenida.

Para eluir el PBG se utiliza AcOH 1 N hasta que los líquidos recogidos den PBG negativo testeando en placa de toque con reactivo de Ehrlich. Con ClH 10% se eluyen las porfirinas hasta fluorescencia negativa observando los eluidos con lámpara ultravioleta.

El ALA obtenido se transfiere a una columna con resina catiónica, se descarta el eluido y se lava con agua para eliminar la urea (con el reactivo de Ehrlich la urea da color amarillo).

El ALA se eluye con 15 ml de ACONa 1 N y se lleva a 20 ml con buffer acetato pH 4,6.

4.2. Reactivo de Ehrlich.

Se prepara con 1 g de 4-dimetil aminobenzaldehido, al

cual se le agrega 30 ml de AcOH glacial y 8 ml de ClO_4H 70% completando a 50 ml con AcOH glacial (228).

4.3. Determinación de PBG.

Se determina en una lícuota de 1.5 ml a la que se agrega 1,5 ml de reactivo de Ehrlich, luego de 10 min. se lee la absorbancia a 555 nm.

4.4. Determinación de ALA.

Primero se pirroliza el ALA (2 metil, 3 acetil 4 carboxietil pirrol) calentando a ebullición 10 min., 10 ml de eluido de la columna catiónica con 0,2 ml de acetilacetona, luego se realiza la reacción colorimétrica como en el punto anterior.

4.5. Calculos.

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

A_m = absorbancia de la muestra.

A_B = absorbancia del blanco.

E_m = $6,2 \times 10^4$ (6).

V_e = volumen final de la colorimetría (ml).

V_a = volumen de la alícuota de la colorimetría.

V_o = volumen de orina sembrado.

V_d = volumen final.

El E_m usado para el ALA pirrol fue $6,2 \times 10^4$ (229).

4.6. Determinación de porfirinas.

El contenido de porfirinas totales se determinó leyendo la absorbancia de los extractos en la banda de Soret realizando

la corrección de Allen para porfirinas según las fórmulas de Rimington y Sveinsson (231).

$$A_{\text{corr}} = \frac{2A_{\text{max.}} - (A_{380} + A_{430})}{K_{1/2}}$$

En estos casos se utiliza su coeficiente medio calculado en base a los coeficientes individuales de cada porfirina y a los % de cada una de ellas en la mezcla (89). En particular para porfirinas de orina se utiliza un $K_{1/2}$ de 1,774 (230).

5. Extracción de porfirinas de hígado.

5.1. Ratas.

Los animales se sacrifican por decapitación. Se extrae el hígado, se lava con solución fisiológica a 0°C, se homogeneiza con ClK 0,134M en relación 1:5 p/v, se toman alícuotas de 1 a 3 ml para animales normales y de 0,3 a 1 para porfíricos, se desproteíniza con ClH concentrado, llevando a una concentración final de ácido del 5%. Se filtra y se lava el precipitado con ClH 5% hasta fluorescencia negativa.

Las porfirinas totales se determinan midiendo la absorbancia de la banda de Soret como se detalla en el punto 4.6 usando un $K_{1/2}$ de 184.

5.2. Embrión de pollo.

Se sigue la técnica de Racz y Marks (232) con algunas modificaciones. El embrión de pollo se sacrifica por decapitación se extrae el hígado, se lava con solución fisiológica

se seca, se homogeneiza con 5 ml de AcOEt:AcOH (4:1 v/v), se centrifuga 15 min. a 15.000 xg.

Si el precipitado tiene fluorescencia se extrae con la mezcla, repitiendo el procedimiento hasta que no contenga porfirinas.

Los sobrenadantes se mezclan con AcONa 3% en ampolla de decantación, se separa la fase acuosa y la fase AcOEt se lava con AcONa 3% dos veces si la fase acuosa tiene fluorescencia se extrae con AcOEt.

Las fases orgánicas se extraen con ClH 5% hasta fluorescencia negativa; se filtran los extractos ácidos por papel Whatman N° 42.

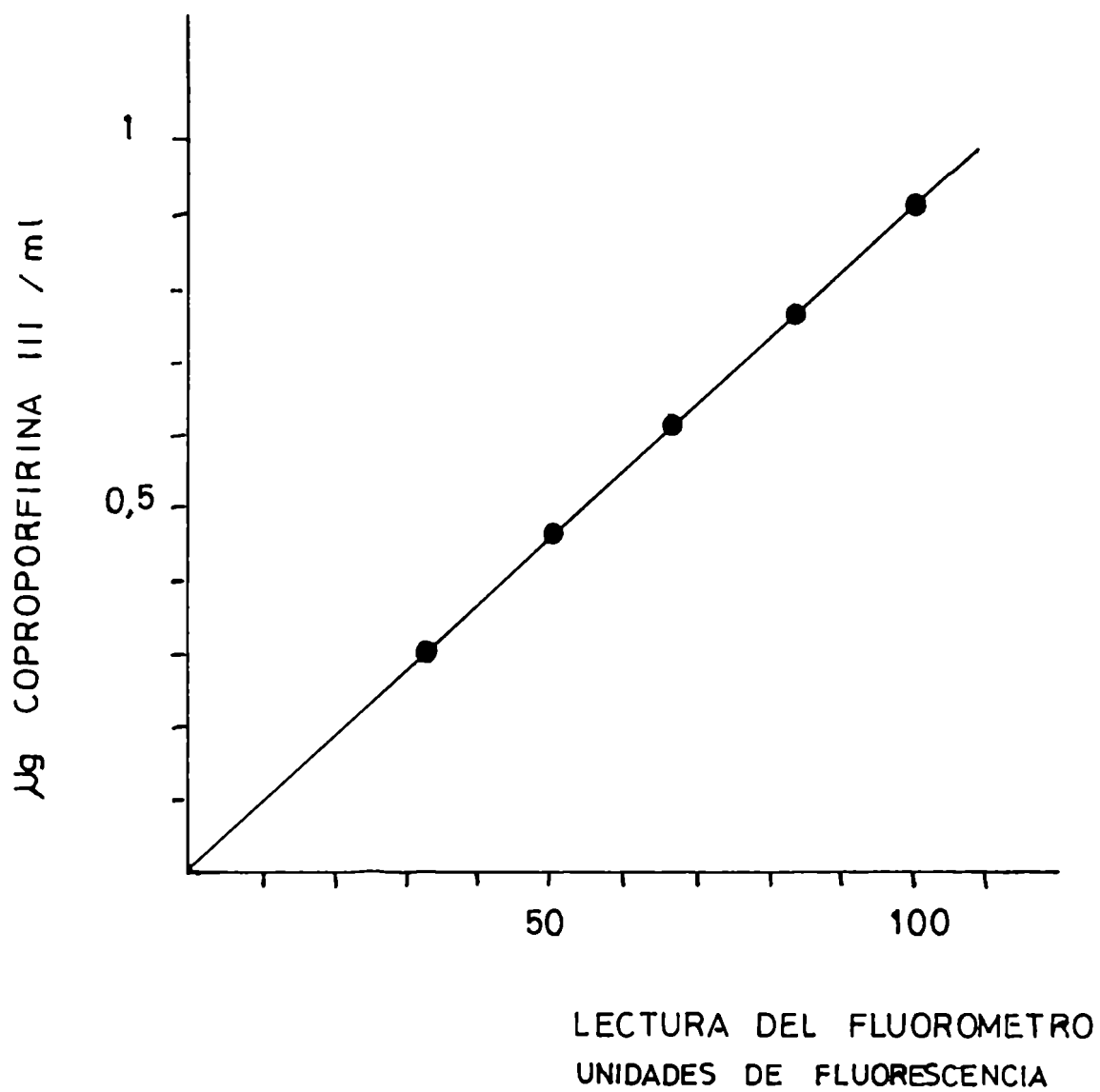
Las porfirinas se leen en un fluorómetro Beckman utilizando Copro III en ClH 5% como standart.

El factor obtenido de la curva de calibración de $\mu\text{g/ml}$ de Copro III vs. unidades de fluorescencia fue $9,23 \times 10^{-3}$ (Fig. 13).

6. Esterificación de porfirinas libres.

Las porfirinas libres y secas (desecador con Cl_2CaOHNa) se esterifican con 20 ml metanol: SO_4H_2 (19:1, v/v). La solución se deja en oscuridad 24-48 hs. a temperatura ambiente si hay Proto se deja entre 18-24 hs. Luego se extraen con cloroformo utilizando AcONa saturado para ajustar el pH a 4,5. Se hacen dos lavados con agua y el último con ClNa 7% o agua según el tipo de cromatografía utilizada para la separación de porfirinas. Para cromatografía en papel o placa se utiliza

Fig.13 CALIBRACION DEL FLUOROMETRO



ClNa 7% y para cromatografía líquida de alta presión, agua, pues suelen quedar restos de sales en la fase clorofórmica que tapa los filtros de las columnas.

Todos los lavados, se extraen con cloroformo hasta fluorescencia negativa.

El extracto clorofórmico final se filtra y concentra al vacío en baño maría y las muestras que contienen Proto, se evaporan sin calentar con flujo de N_2 .

7. Separación de porfirinas metil ester.

7.1. Método de Falk y Benson (233).

Se base en cromatografía ascendente, en papel y separa las porfirinas de 2 a 8 grupos carboxilos. Se realiza una primer corrida para eliminar impurezas, con el sistema kerosene: cloroformo en relación (1:2 v/v) en cuba saturada con cloroformo. La corrida que separa los componentes de la mezcla es con kerosene : dioxano (2,5: 1 v/v) en cuba saturada con dioxano.

El revelado se realiza con luz ultravioleta, cada banda es eluída con cloroformo y se lee la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DB en la longitud de onda de máxima absorción entre 400 y 410 nm. Se utilizan los coeficientes de extinción de Salum y col. (234), para las porfirinas de 5- y 6-COCH se utilizan valores aproximados, calculados suponiendo una función lineal entre el número de COOH y la recíproca del coeficiente de extinción.

Los valores de la recíproca de los coeficientes usados

fueron 5,6 para Copro, 5,2 para (Penta + Hexa), 4,9 para Firia y 4,5 para Uro.

7.2. Cromatografía en capa delgada por el método de Doss (235).

Se utilizan placas de sílica gel 60 F₂₅₄ de Merck de 0,25 mm de espesor. Se lavan sucesivamente con cloroformo: metanol 2:1 v/v y 1:2 v/v se secan y reactivan a 80°C 30 min.

La corrida se realiza con benceno:AcOEt:metanol (85:13,3:1,5). La cromatografía se revela con luz ultravioleta. Se marcan las bandas, se raspa la sílica y se eluyen con cloroformo, se lee en el máximo de absorción como en el punto 7.1.

7.3. Cromatografía líquida de alta presión.

Se detalla aparte la puesta a punto de este sistema, ver capítulo I de Resultados.

8. Medición de actividad de ALA-sintetasa hepática.

8.1. Rata.

Se utiliza el método de Marver y col. (236) . Se sacrifica el animal por decapitación, se extrae el hígado y se lava con solución fisiológica, se trabaja a 0°C, se homogeneiza en una relación 1:3 p/v con una solución que contiene 0,9% de ClNa, 0,5 mM de EDTA, 10 mM de Tris ClH pH 7,4. La mezcla de incubación contiene 10^{-1} M; EDTA 10^{-2} M "buffer", Tris ClH 8×10^{-2} M y 0,5 ml de homogenato se incubaba a 37°C 1 h. con agitación, se desproteíniza con 0,5 ml TCA 25% en frío. Se centrifuga a 2500 rpm 15 min.

El sobrenadante se lleva a pH 4,6 con OHNa 5 N. Se realizan ensayos blancos, donde se pone primero el TCA y luego el homogenato.

Se pirroliza el ALA usando 1 ml de mezcla incubado con 1 ml de "buffer" acetato 0,1 M pH 4,6 y 0,05 ml de acetilacetona calentando a 100°C 10 min. Luego de realizar la colorimetría con el reactivo de Ehrlich se lee la absorbancia a 555 nm y se utilizó un E_m de $6,1 \times 10^4$.

8.2 Embrión de pollo.

Se sacrifican los embriones por decapitación, se extraen los hígados, se lavan con solución fisiológica, se secan y se homogeneizan con igual mezcla que en el tópico anterior pero usando una relación 1:4 (p/v). El medio de incubación consiste en glicina $7,5 \times 10^{-2}$ M, EDTA 10^{-2} M, fosfato de piridoxal $1,5 \times 10^{-4}$ M, "buffer" Tris:ClH 6×10^{-2} M y 0,5 ml de homogenato (237) se sigue igual procedimiento que en 8.1.

9. Medición de actividad de porfirinógeno carboxilasa en hígado de rata.

9.1. Preparación de amalgama de sodio al 3%.

Se sigue la técnica descrita por San Martín de Viale (238) 15 g de Hg se calientan a 30-40°C en cápsula de porcelana; con una varilla larga con punta estriada se pincha pequeños trozos de Na recién cortados (secandolo del kerosene con papel de filtro) y se adicionan al Hg en total 1 g. de Na.

Se realiza bajo campana teniendo precaución por las posibles proyecciones.

El amalgama se endurece al enfriar se guarda en frasco bien seco bajo cloruro de calcio.

9.2. Preparación de porfirinógeno.

Se basa en la metodología de Fisher y Stern (239) y Mauzerall y Granick (72). Se reducen las porfirinas libres disueltas en DHNa 25 mM con amalgama de sodio 3% (0,2 a 1 g/ml) recientemente pulverizada. La decoloración de la solución y pérdida de fluorescencia evidencia la reducción a porfirinógeno. Se filtra con vacío através de una placa filtrante de poro fino. El pH de la solución se ajusta a 7-7,2 con PO_4H_3 40% p/v bajo N_2 . Dado que el estado reducido es inestable, se trabaja bajo tenue luz roja y se usa inmediatamente.

9.3. Preparación enzimática.

Según las experiencias se utiliza, sobrenadante de 11.000 xg del hígado tal cual o perfundido o enzima purificada. En el caso de animales porfíricos se eliminan las porfirinas acumuladas por columnas de Sephadex G-25 poro grueso equilibrados con "buffer" fosfato 0,134 M pH 6,8 (170, 171).

9.4. Medio de incubación.

Consiste en "buffer" fosfato de potasio 0,067 M pH 6,8 GSH 10^{-3} M, EDTA 10^{-4} M, Uro'gen III 2 μM y preparación enzimática en un volumen final de 3 ml.

La reacción se realiza en tubos de Thunberg en anaerobiosis a 37°C y oscuridad durante 30 min. Se detiene la reacción, re-oxidando el porfirinógeno en presencia de luz y desproteinizando con ClH concentrado en una concentración final de 5% en frío (171). Se filtran los incubados por papel S5 595 y se lavan los tubos con ClH 5% hasta fluorescencia negativa. Se secan los extractos de ClH en desecador, las porfirinas se esterifican y pasan a cloroformo luego se separan por métodos cromatográficos.

La cantidad de proteínas incubadas fueron para sobrenadante aproximadamente 9 mg. y para sobrenadante de hígados perfundido aproximadamente 6 mg. y para enzima purificada entre 1,5 y 3 mg.

9.5. Expresión de resultados.

Los resultados se expresan como: a) desaparición de sustrato =
$$\frac{\text{nmol de porfirinas de } 7\text{-} + 6\text{-} + 5\text{-} + 4\text{-COOH}}{30 \text{ min mg. proteína.}}$$

b) formación de Copro'gen =
$$\frac{\text{nmol de porfirinas de } 4\text{-COOH}}{30 \text{ min mg. proteína.}}$$

c) como formación de cada uno de los productos formados.

10. Modificación del sito activo de la PCL .

10.1. Reacción con 2,3-butanediona.

La reacción de 1,5 a 3 mg de proteína se incubaba con 5 y 50 mM de butanediona en "buffer" borato a pH 7,6 durante 5, 10 y 15 min a 25°C en un volumen final de 0,9 ml. Los controles fueron hechos sin reactivo .

10.2. Foto-oxidación con azul de metileno.

Se realiza en "buffer" fosfato 0,067 M pH 6,8, con 0,003% de colorante, y de 1,5 a 3 mg. de proteínas en un volumen final de 2 ml a temperatura ambiente. Estas soluciones fueron iluminadas por una lámpara tungsteno de 100 Watts, centrada a 10 cm. de los tubos durante 15 y 30 minutos a 25°C. Los ensayos control se mantuvieron en oscuridad. El colorante se eliminó por filtración a través de columnas de Sephadex G-25 (1 x 25 cm) previo a la determinación de PCL.

10.3. Reacción con fenilglioxal.

Se realiza en "buffer" fosfato 0,067 M pH 6,8 con fenilglioxal 0,5, 2,5 y 25 mM con 1,5 a 3 mg de proteínas en un volumen final de 2,4 ml durante 15 min. a 25°C. El exceso de reactivo se elimina como en el tópico anterior.

10.4. Reacción con dietilpirocarbonato de sodio (DEPC).

- a) Se ensayó a 0,005; 0,5; 1; 5 y 25 mM DEPC durante 15 min en 5 mM de buffer fosfato de potasio 5 mM pH 6,8 con 1,5-3 mg de proteínas en un volumen final de 1,2 ml a 25°C. El exceso de reactivo se elimina como en 10.2.
- b) En los ensayos de protección y reversión se utilizó 1 mM de DEPC en igual "buffer" con la misma cantidad de proteínas pero en un volumen final de 0,72 ml, el exceso de reactivo se elimina por "quenching" con "buffer" conteniendo 20 mM de imidazol. El DEPC se diluyó con etanol.

alcanzando el mismo una concentración en el medio de incubación del 3%.

La reversión de la reacción se realizó con hidroxilamina 0,8 M en el medio de incubación durante 1 h. a 25°C. En cada experimento se realizaron todos los controles (sin reactivo, con etanol 3% o con hidroxilamina).

10.5. Ensayos de protección.

En los ensayos de protección se preincuba la enzima con Uro'gen III previo a la modificación con 2,3-butanediona o DEPC.

11. Determinación de PCL de sangre.

Se siguió el método descrito por Ríos de Molina (226) se centrifugó la sangre heparinizada 15 min. a 900 xg los glóbulos rojos se lavan con solución fisiológica y se hemolizan. El hemolizado se centrifuga a 35.000 xg 60 min., y el sobrenadante se utiliza como fuente enzimática. Las incubaciones se realizan como en 9.4. pero la desproteínización se realiza con AcO Et: AcOH (3:1 v/v).

Las porfirinas se extraen luego de varios lavados con agua, con ClH 10%. Luego se procede como en 9.4.

12. Determinación de Proteínas.

Se realiza por método de Lowry y col. (240) con seroalbúmina bovina como standard.

13. Cromatografía gaseosa.

Se utilizó un cromatógrafo gas-líquido con detector de captura electrónica de ^{63}Ni , marca Hewlett-Packard 5840 A. Las columnas fueron de vidrio de 2 m de longitud y 2mm de diámetro interno, relleno con 3% de OV-17 o bien con 5% de OV-101, en ambos casos empleando como soporte Chromosorb WAW/DMCS 80-100 Mesh. Se utiliza N_2 de cuatro bandas, extra seco. La temperatura de inyección fué 258°C, la del detector de ^{63}Ni 300°C, la temperatura de columna 160°C.

14. Presentación de resultados.

Los resultados presentados son el promedio de dos o tres experimentos donde cada ensayo se realiza por duplicado.

15. Tratamiento estadístico.

Se utiliza el test "t" de student. y el test no paramétrico de Kruskal Wallis (241).

OBJETIVOS

1. Ampliar el campo metodológico del análisis de las porfirinas en fluidos biológicos y en ensayos de incubación.
2. Realizar estudios tendientes a elucidar el rol de los productos metabólicos del HCB en el establecimiento de porfiria.
3. Ampliar conocimientos sobre el rol del Fe en la porfiria experimental por HCB y por ende en la PCT humana con un posible enfoque terapéutico.
4. Estudiar si el severo decremento de la actividad de porfirinógeno carboxilasa producida por la administración "in vivo" del HCB se debe a modificaciones de la estructura proteica de la enzima, en lo concerniente a su sitio activo.

R E S U L T A D O S

Y

D I S C U S I O N .

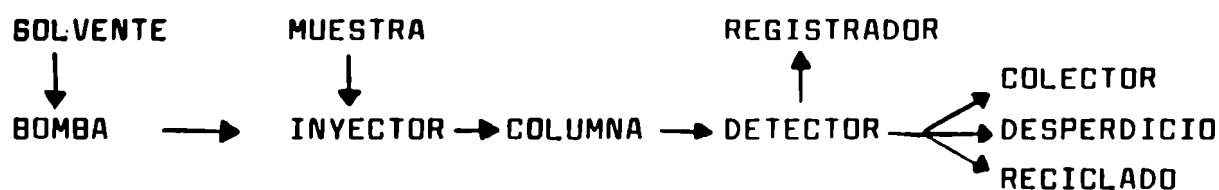
C A P I T U L O I .

CROMATOGRAFIA, LIQUIDA DE ALTA PRESION.

1. Principios Generales.

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) es una técnica que se usa para separar los componentes de una mezcla química. Estos componentes se disuelven en un solvente líquido y son forzados a fluir a través de una columna cromatográfica bajo presión. Por esta técnica se logró fácilmente la separación de una variedad de mezclas químicas.

Los componentes de un cromatógrafo líquido incluyen una bomba, inyector, columna, detector y registrador, conectado de la siguiente manera:



El corazón del aparato es la columna, como la fase estacionaria está compuesta por partículas del tamaño del micrón, se necesita una bomba de alta presión para mover la fase líquida a través de la columna. En base a qué grupos funcionales tenga el absorbente usado como relleno se desarrollan los distintos tipos de cromatografía (242).

CROMATOGRAFIA	GRUPO FUNCIONAL	NOMBRE COMERCIAL
Adsorción y par tición fase nor- mal.	-Si-OH	Porasil Radial. PaKB Corasil

CROMATOGRAFIA	GRUPO FUNCIONAL	NOMBRE COMERCIAL
"Bonded Phase"	$-\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$	C_{18} Corasil μ Bondapak C_{18} Radial-Pak-A
Fase reversa	$-\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ $-\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$	μ Bondapak NH_2 μ Bondapak CN
Intercambio Iónico.	$-\text{Si}-\text{O}-\left[(\text{CH}_2)_3-\text{N}-\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]^+ \text{OH}^-$	Bondapak Ax
	$-\text{Si}-\text{O}-\left[\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3^- \right]^- \text{H}^+$	Bondapak Cx
Tamiz molecular.	estireno-divinilbenceno "bonded" sílica	Syrigel μ Bondagel
Par iónico	idem fase normal o fase reversa.	

Par iónico.

Este tipo de cromatografía es una combinación de cromatografía líquido-líquido e intercambio iónico, surge de la dificultad de resolver muestras de compuestos con ionizaciones múltiples. Lo más común es usar fase reversa, la fase móvil consiste en un buffer acuoso más un co-solvente orgánico y un contraión de carga opuesta a las moléculas de muestreo (tetrabutil amonio (Pic), tetra etilamonio ClO_4^- , picrato, etc).

2. Parámetros fundamentales en Cromatografía (242).

1) Factor de capacidad: $K'_n = \frac{V_n - V_o}{V_o}$ ó $\frac{t_n - t_o}{t_o}$ da idea

de la distancia al origen donde V_n es el volumen de elución de la sustancia n, V_o es el volumen de elución de una sustancia que no sea retenida, t_n es el tiempo de retención de la sustancia n y t_o , el tiempo que tarda en salir una sustancia que no es retenida.

2) Factor de separación: $\alpha_{[n, (n-1)]} = \frac{V_n - V_o}{V_{n-1} - V_o} = \frac{t_n - t_o}{t_{n-1} - t_o} = \frac{k'_n}{k'_{n-1}}$

da la separación entre picos.

3) Platos teóricos: $N = 16 \frac{V_n^2}{W_n}$ marca la eficiencia del

sistema donde V_n volumen de elución de la sustancia n y W_n el ancho del pico.

4) Resolución $R_{[n, (n-1)]} = \frac{1}{4} \left| \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right| \cdot \left| \sqrt{N} \right| \cdot \left| \frac{k'}{k' + 1} \right|$

selectividad eficiencia capacidad

3. Aplicación a la separación de porfirinas.

La aplicación de cromatografía líquida de alta presión a la separación de porfirinas ha provisto de un método rápido eficiente y reproducible al campo de las porfirinas tanto

para los análisis clínicos tendientes a identificar los distintos tipos de porfiria como para las investigaciones que se llevan a cabo en estos terrenos.

Petryka y Pierach (243), han realizado un "review" en 1979 donde describen las distintos tipos de sistemas usados, así como la preparación de las muestras.

Básicamente, podemos dividir, en dos grupos las técnicas usadas: a) separación de porfirinas metil éster en columnas de sílica en fase normal, con elución isocrática o gradiente, que logra la separación de porfirinas de 2 a 8 grupos carboxilos además de Copro-, Isocopro y dehidrocoproporfirina, Meso- y Proto- porfirinas, Copro I y III y de Copro I a IV.

b) Porfirinas libres en fase reversa, usando gradiente de elución o par iónico con gradiente de elución para separar porfirinas de 2 a 8 grupos carboxilos o isocrático para menor número de componentes o isómeros. También se ha reportado el uso de intercambio iónico para separar porfirinas de 2 a 5 grupos carboxilos.

4. Equipo.

En el presente trabajo se ha usado un cromatografo líquido marca Waters Associates, Mildford, Mass equipado con columnas de μ Bondapack C₁₈ o μ Porasil (3,9 mm x 30 cm) una bomba Waters modelo 6000 A con un inyector U6K con un detector de absorbancia modelo 440, UV, a 405 nm y un registrador.

5. Solventes.

Los solventes usados fueron n-heptano, Carlo Erba RPE, o Sintorgan grado HPLC, acetato de metilo Fluka para HPLC ó Carlo Erba RPE, benceno Carlo Erba RPE, acetato de etilo Carlo Erba RPE o Sintorgan para HPLC, metanol, Carlo Erba RPE, H₂O bidestilada, acetonitrilo Carlo Erba RPE e isooctano Carlo Erba RPE. Todos los solventes fueron filtrados a través de membranas de 0,5 μ m antes de ser usados.

6. Preparación de las muestras.

Las porfirinas usadas como patrones para la calibración fueron cedidas gentilmente por Dra. L. San Martín de Viale quien las purificó por columnas de carbonato de calcio y óxido de magnesio (238). Penta fué cedida por Dr. Horacio Sancovich, obtenida de síntesis, como estaba contaminada fué purificada por HPLC, Uro fué obtenida también de Porphyrin Products.

Las porfirinas provenientes de orinas de pacientes fueron obtenidas según el método descrito por Wainstok de Calmanovici (229) como se detalla en Métodos usando resinas Dowex ó por el uso de resinas "Acidite FFIP₃" (Permit Gran Britain, Lockwood Co.). Básicamente este último método consiste en ajustar el pH de 10 ml orina a 3, se agrega 2 g de resina, se agita 5 min. y se agrega resina hasta llegar a fluorescencia negativa en la orina. Se decanta la resina, se lava con 15 ml de H₂O, luego con 10 ml de metanol luego se agrega 20 ml de mezcla esterificante y se sigue

el procedimiento habitual para obtener las porfirinas metil éster.

Las porfirinas provenientes de decarboxilación del Uro'gen, o acumuladas en hígado de animales se tratan según se describió previamente en Métodos.

7. Resultados y discusión.

En los primeros intentos realizados en nuestro laboratorio para lograr la separación de porfirinas de 2 a 8 grupos carboxilos libres se usó fase reversa en columnas de μ Bondapak C_{18} . Se debe tener en cuenta que no se tiene el sistema para generar gradiente, ni tampoco un integrador por lo tanto, se necesita que los componentes de las muestras se resuelvan con elución isocrática, y que los picos queden suficientemente separados como para poder medir su área. La Tabla IV muestra los resultados obtenidos, como puede verse en ella mezclas de metanol: H_2O de diferentes porcentajes si bien logran separar porfirinas de 7 a 4 grupos carboxilos no resuelven Uro III de Firia III. Se intentó entonces utilizar el método de par iónico que fué aplicado para la separación de porfirinas 4 a 8-COOH por Bonnett y col. (244) usando 80% de metanol y 1 mM Pic, aunque la separación de Uro y Firia obtenida por ellos no era buena ($V_{Uro} = 3$ ml y $V_{Firia} = 3,5$ ml). En nuestro caso se usó metanol 50% y 2 mM de Pic o 4 mM de Pic y (metanol: H_2O : etanol) (54,5: 36,5: 9) 2 mM Pic siendo más eficaz la primer mezcla de solventes pero igual que Bonnett y col. (244) la resolución de las porfirinas más carboxiladas no fué óptima

($V_{Uro} = 2,8$ ml y $V_{Firia} = 3$ ml). Cabe aclarar que con estos sistemas, corridas realizadas en el mismo día, tenían una variación de hasta un 10% en los volúmenes de elución, no manteniéndose la distancia entre picos.

Utilizando el sistema de fase reversa o par iónico con elución por gradiente, con (metanol: H_2O) (acetonitrilo: H_2O), se han reportado muy buenas separaciones de las porfirinas de 4 a 8 grupos carboxilos (245, 246, 247, 248).

Los resultados aquí presentados para lograr la separación de porfirinas libres de 2 a 8-COOH no fueron satisfactorios para emplear de rutina en la separación y cuantificación de porfirinas de 4 a 8-COOH que es la habitual para medir actividad de PCL.

Se intentó luego, ajustar las condiciones para resolver Copro III de Proto IX arrojando buenos resultados (Tabla IV) con los dos sistemas empleados que son modificaciones del método de Smith y col. (249) que logra muy buena separación entre Copro III y Proto IX usando (metanol: H_2O : AcOH) (83: 15: 2).

La separación de porfirinas de 4 a 8-COOH metil éster con elución isocrática, pudo lograrse con cuatro sistemas de solventes, acetato de metilo: n-heptano (40 : 60) acetato de etilo: n-heptano (50 : 50), acetato de metilo: isoocetano (50 : 50) y benceno: acetato de etilo: metanol (85 : 13 : 1) que son reproducción tal cual o con modificación de sistemas ya reportados (250, 251, 252).

En todos los casos se emplea un flujo de 1,5 ml/min y una velocidad de papel de 0,5 cm/min.

TABLA IV. SEPARACION DE PORFIRINAS LIBRES EN FASE REVERSA USANDO COLUMNA
DE μ BONDAPAK C 18.

S O L V E N T E	Flujo ml/min	Velocidad del papel cm/min	P o r f i r i n a s Volumen de elución (ml)					
			Uro III	Firia III	Hexa III	Penta III	Copro III	ProtoIX
85% metanol 15% H ₂ O	1	0,5	2,4	2,4	2,5		3	
65% metanol 35% H ₂ O	1	0,5	3	3				4,3
50% metanol 50% H ₂ O	1	0,5	2,4	2,4	2,9	3,9		7,2
50% metanol 50% H ₂ O 2mM "Pic"	1	0,5	2,8	3	4	4,4		7,8
50% metanol 50% H ₂ O 4mM "Pic"	1	0,5	4,7	4,7				
54,5% metanol 36,5% H ₂ O 9% etanol 2mM "Pic"	1,5	0,5	3,6	3,75	5,4			6,1
85% acetonitrilo 13% H ₂ O 2% acético	1,5	0,5						6,9 12,6
87% metanol 11% H ₂ O 2% acético	1,5	0,5						9 13,5

Los primeros sistemas empleados fueron acetato de metilo: n-heptano y acetato de metilo: iso-octano con ambos se logró buena separación como puede verse en las Tablas V y VI. Se eligió el primero para usar de rutina, dada la mayor disponibilidad del acetato de metilo respecto del iso-octano en ese momento. El sistema que contiene benceno (Tabla VII) también dió buenos resultados pero se desechó por la toxicidad del mismo. En el sistema de acetato de etilo (Tabla VIII) la resolución entre picos es menor respecto al que emplea acetato de metilo pero resulta más económico además de la facilidad para acceder al mismo en el país.

Se realizó la calibración para cada porfirina de 2 a 8 carboxilos para el sistema de n-heptano: acetato de metilo y de 4 a 8 carboxilos para el que emplea acetato de etilo midiendo el área debajo de los picos en función de los nmoles de porfirinas inyectadas. Los resultados tratados por cuadrados mínimos pueden verse en las Tablas IX y X

La aplicación de esta técnica en el campo de las porfirinas es muy amplia. En particular se ilustran los resultados obtenidos en el presente trabajo con acetato de metilo: n heptano en diversas situaciones: a) productos de decarboxilación del Uro'gen III por acción de PCL de hígado de ratas normales que puede verse en la Fig. 14, donde se han ensayado distintas proporciones de sustrato y enzima PCL, b) productos de reacción de PCL de eritrocitos humanos normales, con PCT Y con porfiria aguda intermitente, cuyos perfiles pueden verse en la Fig. 15, c) análisis de porfi-

TABLA V. SEPARACION DE PORFIRINAS METIL ESTER CON EL SISTEMA N-HEPTANO:
ACETATO DE METILO (60 : 40) EN FASE NORMAL.

	T_n (min)	V_n (ml)	W (ml)	K'_n	$\alpha_{n,(n-1)}$	N	$R_{n,(n-1)}$
Cl_3CH no retenido	2	3					
Proto IX	3	4,5	0,6	0,5		1.599	
Copro III	4,5	6,75	0,75	1,05	2,5	1.296	6
Penta III	6,6	9,75	0,9	2,25	1,8	1.878	11
Hexa III	9,5	14,25	1,2	3,75	1,6	2.256	15
Firia III	13,7	20,55	2,1	5,85	1,56	1.532	14
Uro III	22	33	3	10	1,7	1.936	16

Las condiciones de corrida fueron: flujo de solvente 1,5 ml/min, velocidad del papel 0,5 cm/min, presión 600 psi, columna μ Porasil.

TABLA VI. SEPARACION DE PORFIRINAS METIL ESTER CON EL SISTEMA ISOOC-
TANO: ACETATO DE METILO (50 : 50) EN FASE NORMAL.

	T_n (min)	V_n (ml)	W (ml)	K'_n	$\alpha_{n,(n-1)}$	N	$R_{n,(n-1)}$
Cl_3CH	2	3					
Copro III	3,6	5,4	0,6	0,8		1.296	
Penta III	4,4	6,6	0,9	1,2	1,5	1.860	8
Hexa III	5,6	8,4	0,9	1,8	1,5	1.388	10
Firia III	7	10,5	1,2	2,5	1,4	1.225	11
Uro III	9	13,5	1,5	3,5	1,4	1.296	12

Las condiciones de corrida fueron flujo de solvente 1,5 ml/min., velocidad del papel 0,5 cm/min., presión 700 psi, columna μ Porasil.

TABLA VII. SEPARACION DE PORFIRINAS METIL ESTER CON EL SISTEMA BENCENO: ACETATO DE ETILO: METANOL (85 : 13 : 1).

	T_n (min)	V_n (ml)	W (min)	K'_n	$\alpha_{n,(n-1)}$	N	$R_{n,(n-1)}$
Cl_3CH	2	3					
Copro III	4,2	6,3	0,9	1,1		784	
Penta III	6	9	1,2	2	1,8	900	8
Hexa III	8	12	1,5	3	1,5	1.024	10
Firia III	11,8	16,4	2,4	4,5	1,5	747	9
Uro III	18,4	27,6	3,9	8	1,8	801	10

Las condiciones de corrida fueron flujo de solvente 1,5 ml/min. velocidad del papel 0,5 cm/min., presión 1.000 psi, columna μ Porasil.

TABLA VIII. SEPARACION DE PORFIRINAS METIL ESTER CON EL SISTEMA ACETATO DE ETILO:N-HEPTANO (50 : 50).

	T_n (min)	V_n ml	W min	K'	$\alpha_{n,(n-1)}$	N	$R_{n,(n-1)}$
Cl_3CH	2	3					
Copro III	4,2	6,3	0,9	1,1		784	
Penta II	5,7	8,5	0,9	1,8	1,7	1.444	10
Hexa III	8	12	1,2	3	1,6	1.600	12
Firia III	11	16,5	2,2	4,5	1,5	860	10
Uro III	16,3	24,4	3,3	7,1	1,6	878	11

Las condiciones de corrida fueron flujo 1,5 ml/min., velocidad del papel 0,5 cm/min., presión 1.000 psi, columna μ Porasil.

TABLA IX. CALIBRACION.
SISTEMA N-HEPTANO: ACETATO DE METILO.

Amplitud de escala 0,100.

Porfirina	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación lineal
Proto	19,4 \pm 0,9	0 \pm 0,02	0,980 \pm 0,03
Copro	10,5 \pm 0,9	0 \pm 0,04	0,94 \pm 0,05
Penta	12,2 \pm 0,1	0 \pm 0,04	0,96 \pm 0,04
Hexa	8,7 \pm 0,6	0 \pm 0,03	0,97 \pm 0,05
Firia	9,9 \pm 0,2	0 \pm 0,03	0,99 \pm 0,05
Uro	12,2 \pm 0,4	0 \pm 0,02	0,99 \pm 0,05

Amplitud de escala 0,050.

Porfirina	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación lineal
Proto	43 \pm 1	0 \pm 0,1	0,97 \pm 0,09
Copro	23 \pm 1	0 \pm 0,1	0,98 \pm 0,06
Penta	26 \pm 2	0 \pm 0,1	0,98 \pm 0,09
Hexa	17 \pm 1	0 \pm 0,06	0,98 \pm 0,06
Firia	19 \pm 1	0 \pm 0,05	0,99 \pm 0,02
Uro	24 \pm 1	0 \pm 0,09	0,99 \pm 0,09

TABLA X. CALIBRACION.
SISTEMA N-HEPTANO: ACETATO DE ETILO.

Amplitud de escala 0,100.

Porfirina	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación lineal
Copro	9,8 \pm 0,9	0 \pm 0,03	0,99 \pm 0,009
Penta	12 \pm 0,9	0 \pm 0,03	0,99 \pm 0,09
Hexa	10,4 \pm 0,9	0 \pm 0,04	0,99 \pm 0,09
Firia	10 \pm 0,9	0 \pm 0,03	0,99 \pm 0,09
Uro	10,5 \pm 0,9	0 \pm 0,04	0,99 \pm 0,09

Amplitud de escala 0,050.

Porfirina	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de correlación lineal
Copro	18,9 \pm 0,9	0 \pm 0,04	0,99 \pm 0,09
Penta	25,4 \pm 0,9	0 \pm 0,04	0,99 \pm 0,09
Hexa	19,9 \pm 0,9	0 \pm 0,04	0,99 \pm 0,09
Firia	21,7 \pm 0,9	0 \pm 0,04	0,99 \pm 0,09
Uro	21,2 \pm 0,9	0 \pm 0,04	0,99 \pm 0,09

rinas primarias de pacientes con porfiria aguda intermitente, coproporfiria, porfiria congénita y porfiria variegata cuyos perfiles pueden verse en las Figs. 16 y 17 y en Fig. 18 puede verse el análisis de porfirinas urinarias de cuatro pacientes con porfiria cutánea tarda, d) separación de porfirinas acumuladas en hígado de embrión de pollo por acción de drogas, resultados que pueden verse en la Fig. 19.

Los resultados alcanzados en la puesta a punto de esta técnica han sido ampliamente satisfactorios pudiendo reemplazarse el uso tradicional de la cromatografía en papel según la técnica de Falk y Benson (233). Lamentablemente, la falta de un sistema generador de gradiente, no permitió obtener la separación de porfirinas libres que evitaría el paso de esterificación de porfirinas. A pesar de ello el uso de fase normal con el consiguiente empleo de solventes orgánicos, alarga la vida útil de las bombas, sellos y conexiones del equipo

Fig. 14. Cromatografía líquida de alta presión aplicada a la medición de PCL hepática de ratas. Distintas condiciones de incubación. Sistema n-heptano: acetato de metilo (60 : 40).

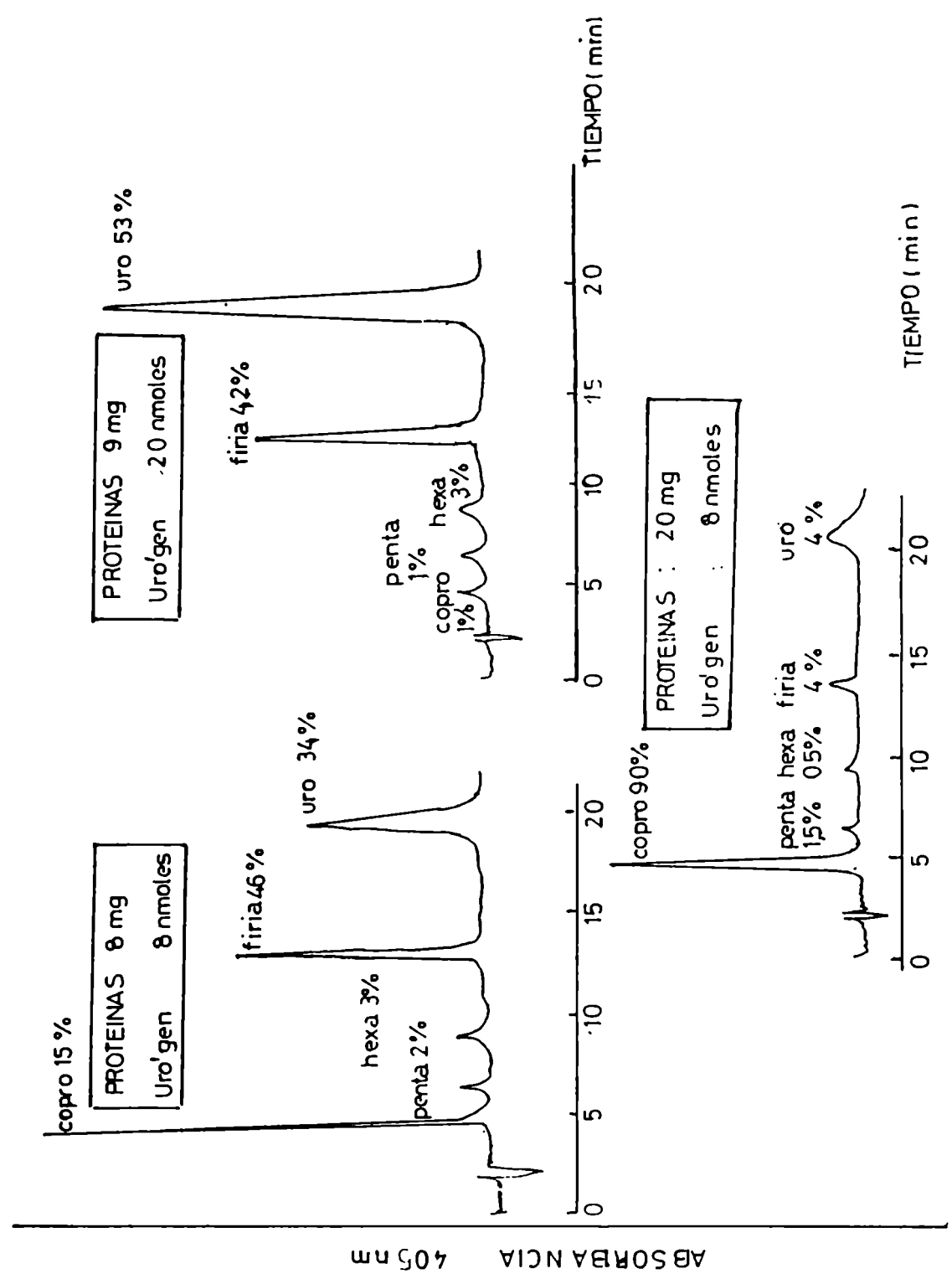


Fig. 14. La fuente enzimática fué sobrenadante de centrifugación de 11.000 xg de homogenato de hígado de ratas normales. Detalles del medio de incubación y obtención de las porfirinas metil ester se detallan en Métodos.

Fig. 15. Cromatografía-líquida de alta presión aplicada a la medición de PCL de eritrocitos humanos, de pacientes normales, y con porfirias. Sistema n-heptano: acetato de metilo (60 : 40).

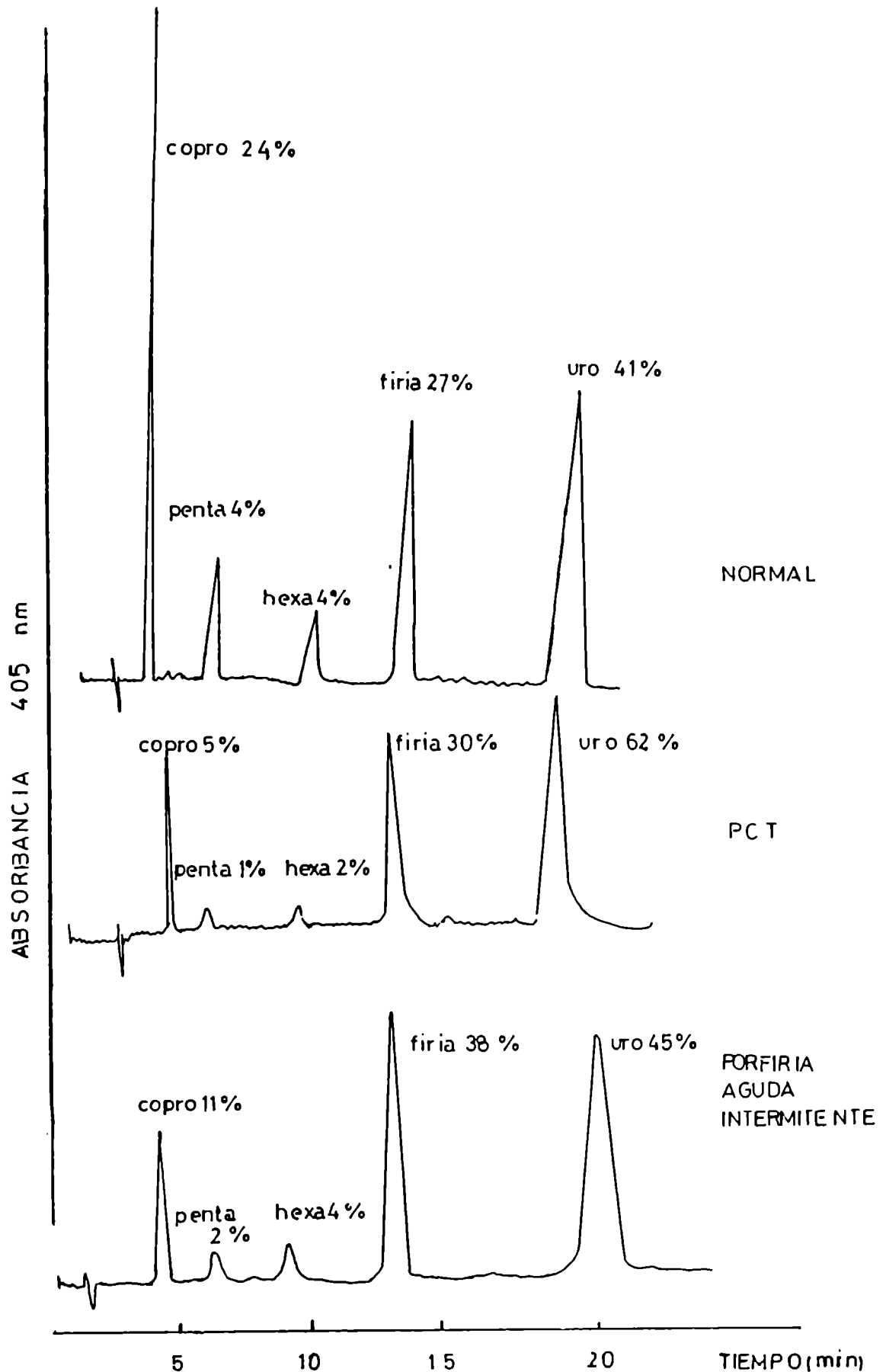


Fig. 15. La fuente enzimática fué sobrenadante de hemolizado de glóbulos rojos proveniente de centrifugación a 35.000 xg 60 min. Detalles de la incubación y posterior procesamientos figura en Métodos.

Fig. 16. Cromatografía líquida de alta presión aplicada a la separación de porfirinas urinarias de pacientes con porfiria aguda intermitente y coproporfiria. Sistema n-heptano-acetato de metilo (60 : 40).

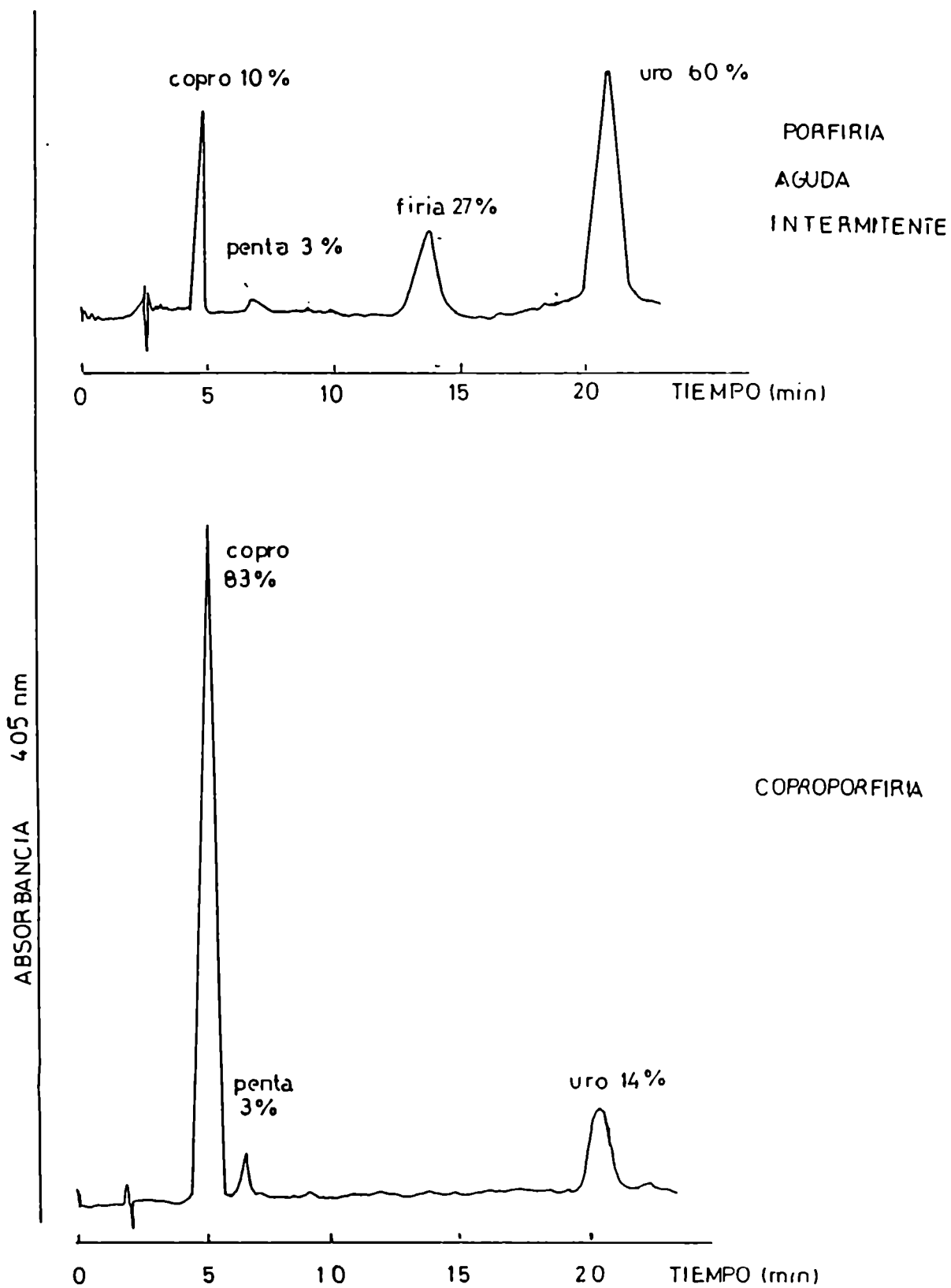


Fig. 16. La extracción de porfirinas y esterificación se
detalla en Métodos e inciso 6 del Capítulo I.

Fig. 17. Cromatografía líquida de alta presión aplicada a la separación de porfirinas urinarias de pacientes con porfirias congénita y variegata sistema n-heptano: acetato de metilo (60 : 40).

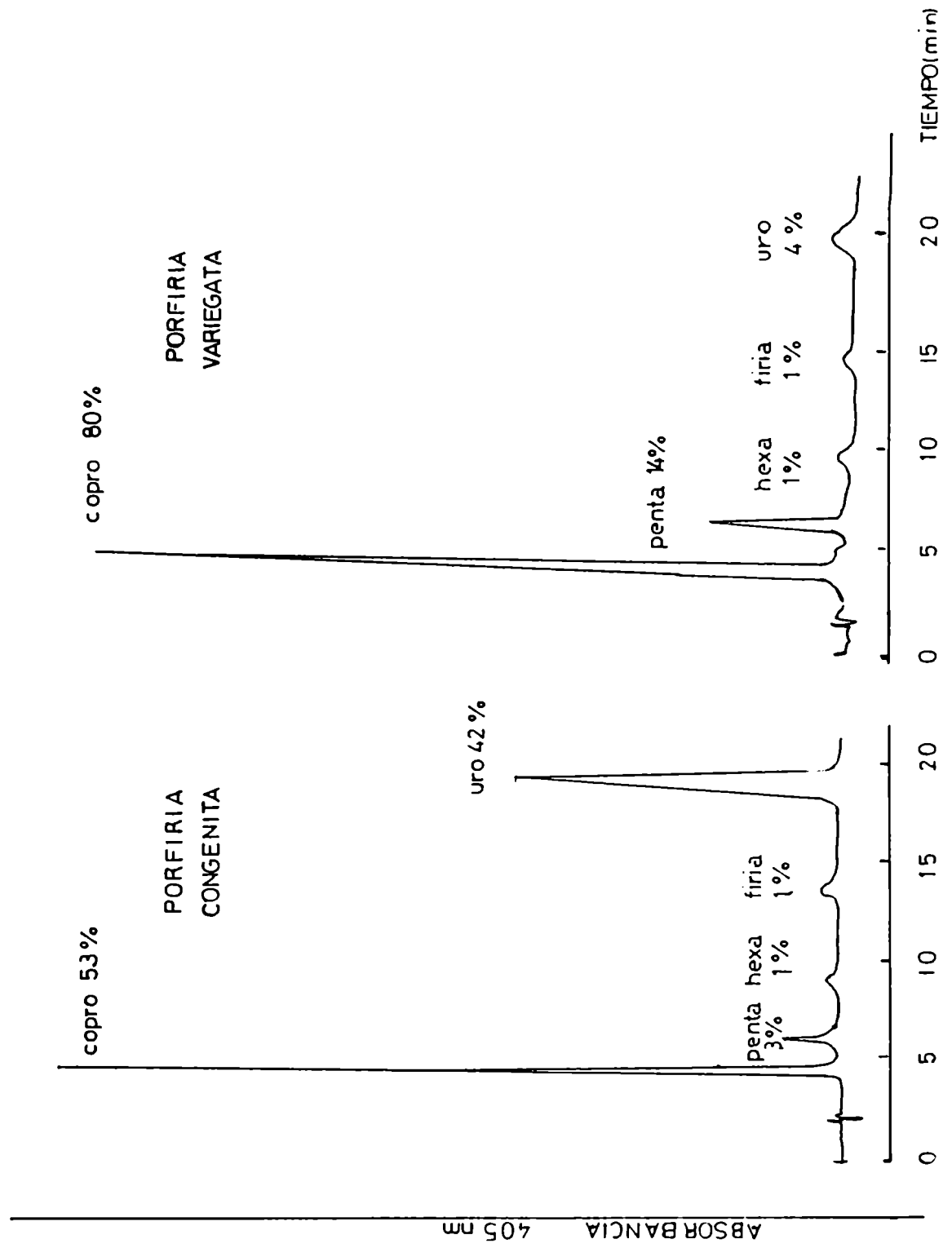


Fig. 17. La extracción de porfirinas y esterificación se detalla en Métodos e inciso 6 del Capítulo I.

Fig. 18. Cromatografía líquida de alta presión aplicada a la separación de porfirinas urinarias de pacientes con PCT. Sistema n-heptano: acetato de metilo (60 : 40).

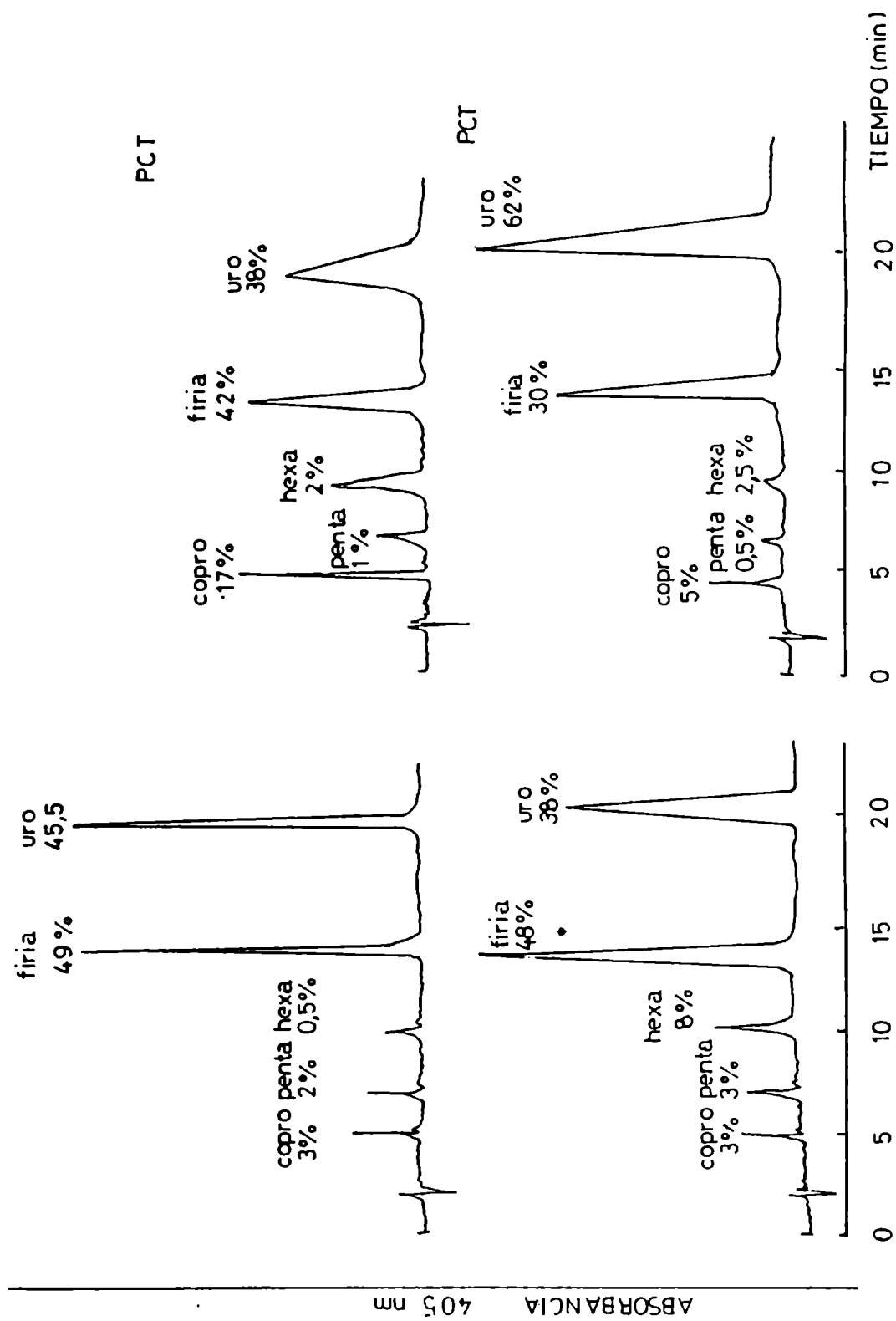


Fig. 18. La extracción de porfirinas y esterificación se
detalla en Métodos e inciso 6 del Capítulo I.

Fig. 19. Cromatografía líquida de alta presión aplicada a la separación de porfirinas de embriones de pollo inyectados con diversas drogas. Sistema n-heptano: acetato de metilo: 60: 40).

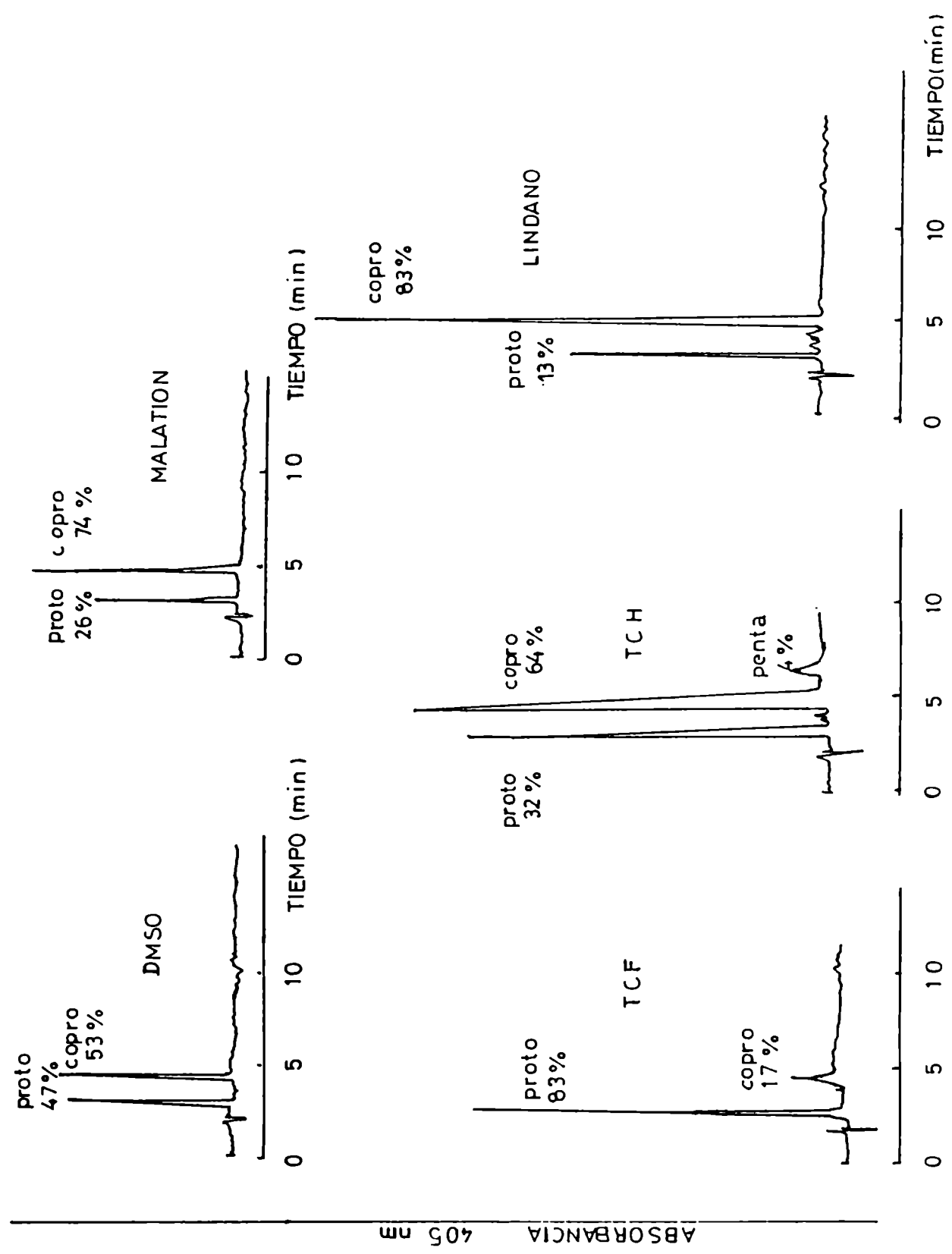


Fig. 19. Todas las drogas fueron disueltas en 0,2 ml de DMSO. Las dosis inyectadas fueron: malatión 60 mg; 2,3,4,5-TCF 5 mg., TCH 7 mg., lindano (2 mg.). En todos los casos se incuban los embriones de pollo de 17 días durante 24 hs. La extracción de porfirinas hepáticas y su esterificación se detalla en Métodos.

C A P I T U L O I I .

"ESTUDIOS TENDIENTES A ELUCIDAR EL MECANISMO DE ACCION DEL HCB".

A. "ROL DE LOS PRODUCTOS METABOLICOS DEL HCB Y ESTUDIOS DEL INHIBIDOR DE PCL OBTENIDO DE HIGADO DE RATAS PORFIRICAS".

Una de las hipótesis respecto del probable mecanismo de acción del HCB hablaba de un rol prioritario de la metabolización del HCB y la formación de un metabolito reactivo capaz de unirse covalentemente a la PCL y producir su bloqueo (173, 182, 206).

Una aproximación para elucidar qué rol jugarían los metabolitos del HCB en el establecimiento de porfiria fué evaluar qué efecto tienen los mismos en el camino metabólico del hemo. Dada la poca disponibilidad de los mismos, se buscó un sistema que sea muy sensible, se eligió entonces el embrión de pollo dado que es un sistema experimental muy útil para estudiar el efecto de drogas en el metabolismo del hemo (232, 253). Con este fin se inyectaron los metabolitos en los embriones de pollo de 17 días, se analizó a las 24 hs. el contenido de porfirinas hepáticas, cuya modificación respecto del control da una pauta de un disturbio en el camino metabólico del hemo. Luego se analizó la naturaleza de las porfirinas, para evaluar si la PCL es la responsable de dicha acumulación. Finalmente se midió la actividad de ALA-S, que es la enzima regulatoria, para aquellas drogas que hubieren afectado el contenido de porfirinas.

Una segunda aproximación fué ver el efecto "in vitro"

de los metabolitos del HCB sobre la actividad de PCL de hígado de rata.

Finalmente dado que se tenía conocimiento de la formación de un inhibidor de PCL de hígado de ratas porfíricas por HCB (205, 206, 207), se trató de aislarlo y caracterizarlo con el fin de evaluar si tenía alguna relación con los productos metabólicos del fungicida .

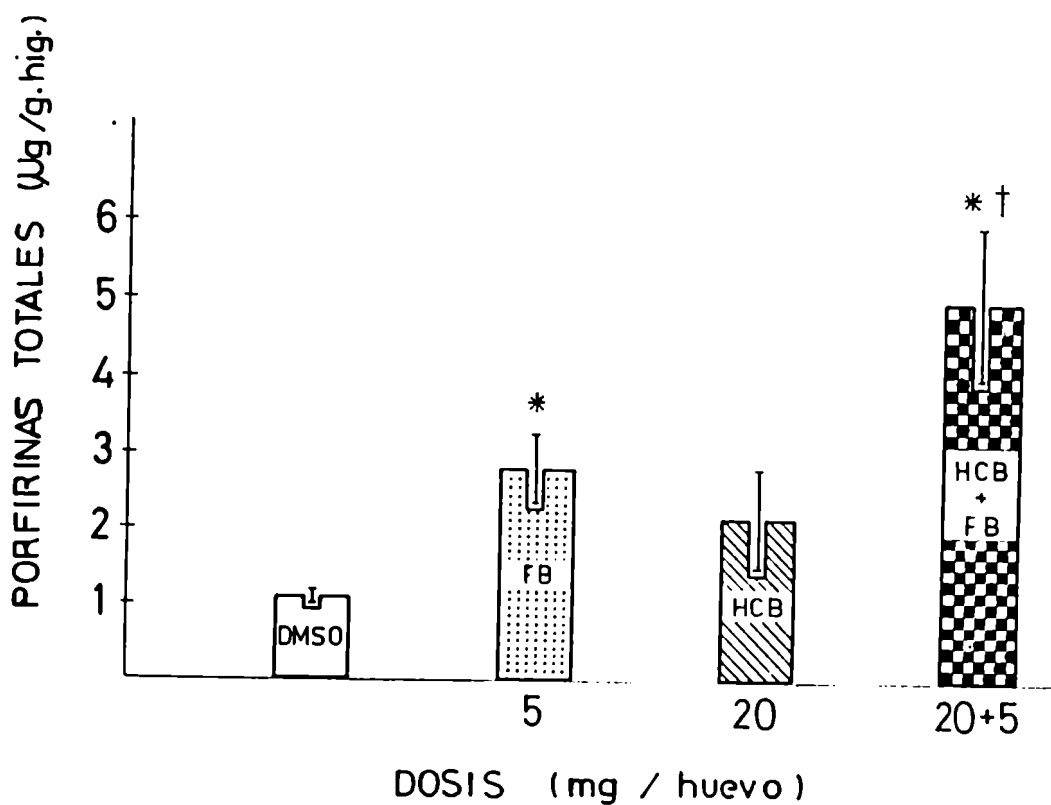
1.-Efecto "in -ovo" de los metabolitos del HCB, sobre el camino metabólico del Hemo.

1.1.- Acumulación de porfirinas en embrión de pollo por efecto de metabolitos del HCB.

Las drogas se inyectan disueltas o suspendidas en 0,2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) en los líquidos que rodean al embrión. Se incuban los huevos a 38°C durante 24 hs. en cámara húmeda.

- a) Efecto del pretratamiento con fenobarbital: HCB en dosis de 20 mg/huevo no produce una significativa variación en el contenido de porfirinas respecto al control con DMSO ($1,1 \pm 0,1$ μ g de porfirinas/g hígado). Cuando los embriones se pretratan con fenobarbital (FB) 5 mg/huevo durante 2 hs. previo a la administración del fungicida, el contenido de porfirinas llegó a 5 μ g porfirinas/g hígado, con una significancia de $p < 0,01$ y $p < 0,05$ respecto de DMSO y FB (Fig.20). Cabe destacar dos hechos: 1) que FB es capaz de inducir significativamente acumulación de porfirinas y

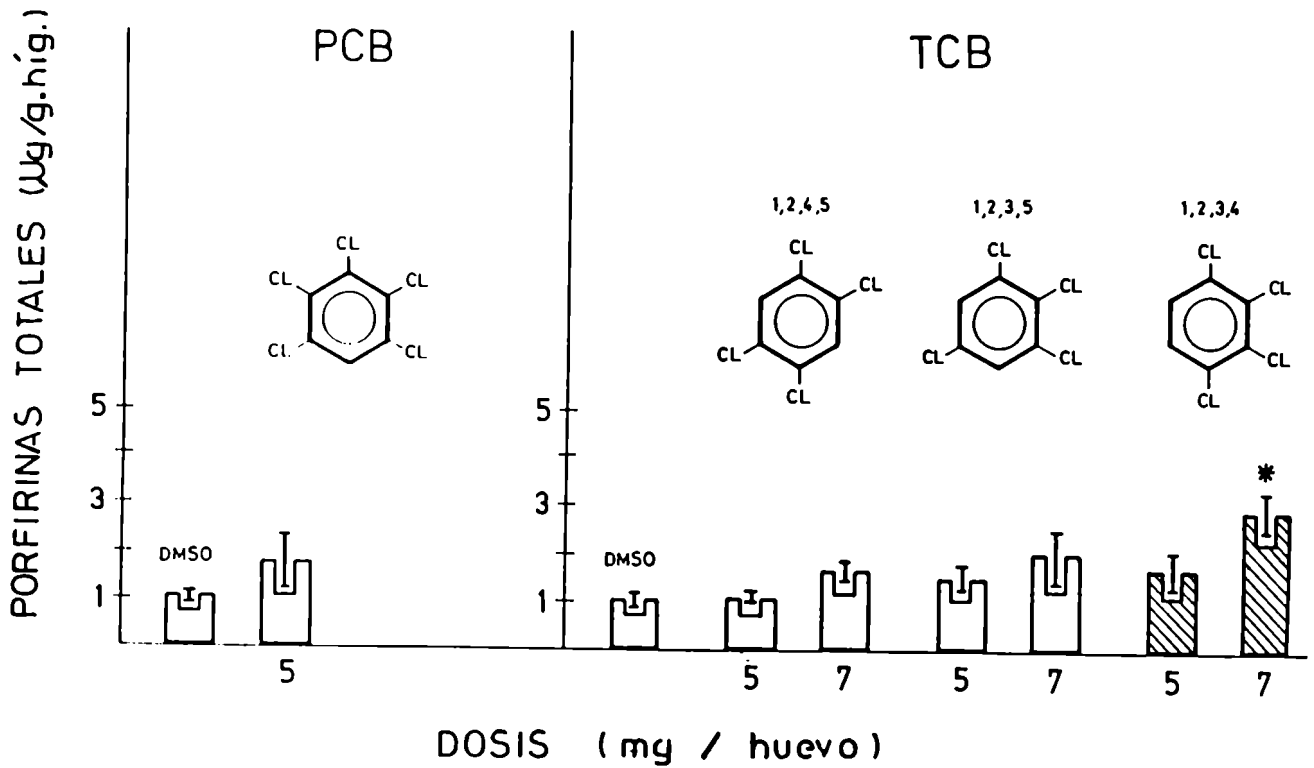
Fig. 20. Efecto porfirinogénico del HCB mediado por fenobarbital, en embrión de pollo.



Fenobarbital (FB) (5 mg) se administra 2 hs. antes de la administración de 20 mg. de HCB a embriones de pollo de 17 días. Después de 24 hs. de incubación, se extraen las porfirinas totales hepáticas y se estiman fluorométricamente como se detalla en Métodos. Las barras abiertas representan al DMSO: * $p < 0,01$ respecto de DMSO † $p < 0,05$ respecto de FB.

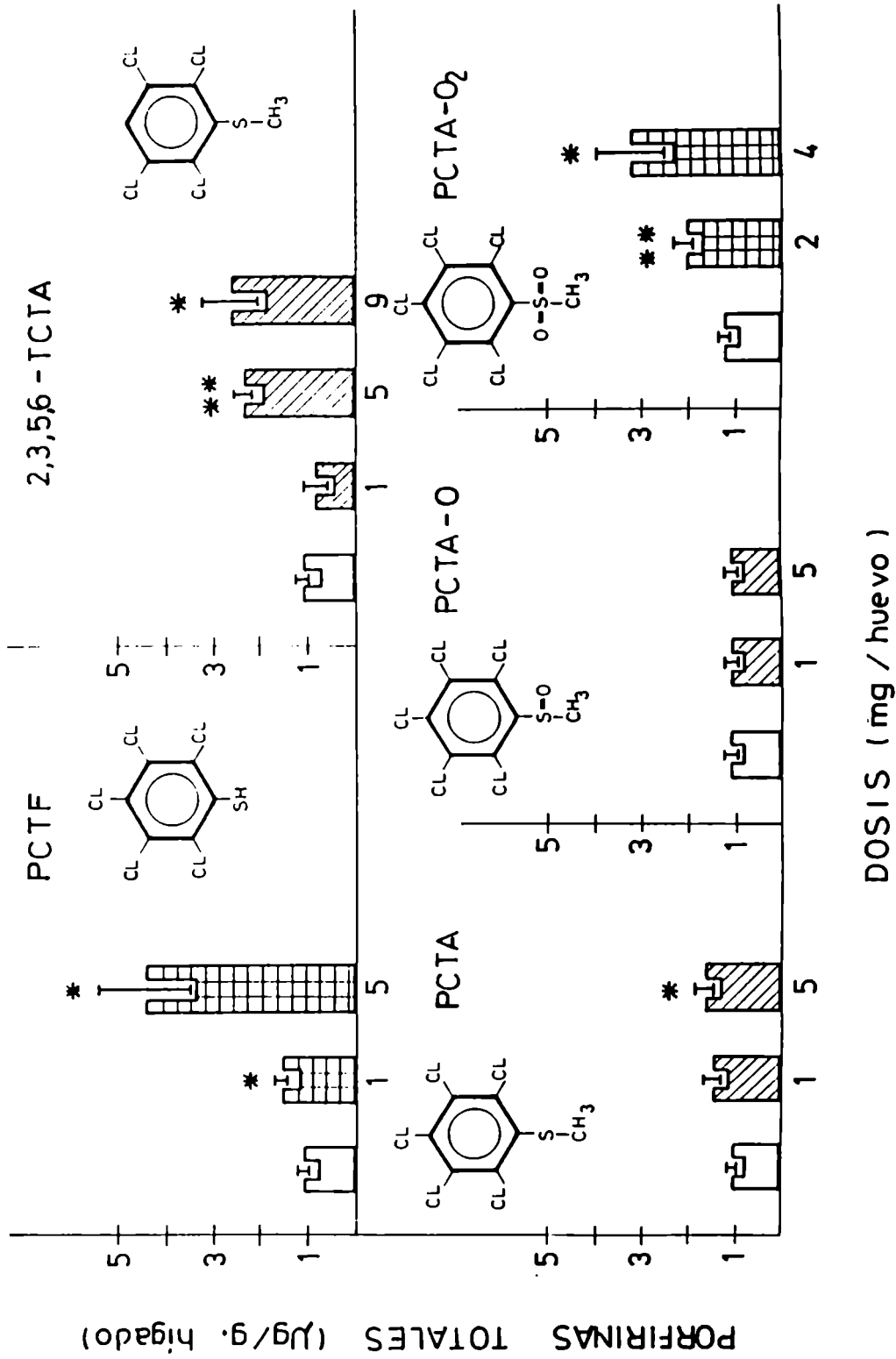
- 2) FB estimula la acción del HCB que por sí solo no es porfirinogénico en este sistema.
- b) Efecto de bencenos menos clorados: PCB y 1,2,3,4-, 1,2,3,5-, 1,2,4,5- TCB fueron probados a 5 y 7 mg/huevo con la excepción del primero que fué ensayado sólo a la menor dosis (Fig. 21). Sólo el 1,2,3,4-TCB a la dosis mayor modificó ligeramente el contenido de porfirinas respecto de DMSO ($2,9 \pm 0,5 \mu\text{g}$ porfirinas/g hígado, $p < 0,05$).
- c) Efecto de metabolitos azufrados: En la Fig. 22, se graficó la acumulación de porfirinas producidas por el tratamiento con distintas dosis de PCTF, 2,3,5,6-TCTA, PCTA-0 y PCTA-0₂. PCTA-0 fué la única droga que no provocó incremento significativo del contenido de porfirinas. PCTF elevó 4,5 veces el valor del control con DMSO y fué el más efectivo de estos metabolitos. Se puede establecer el siguiente grado de acción $\text{PCTF} > \text{PCTA-0}_2 > 2,3,5,6\text{-TCTA} > \text{PCTA}$.
- d) Efecto de metabolitos fenólicos: Como puede verse en Fig. 23 los once compuestos fenólicos ensayados inducen acumulación de porfirinas significativamente respecto del control ($p < 0,05$ - $p < 0,001$), siendo los más efectivos TCH y TrCF. TCH produce en dosis de 5 mg/huevo $7,5 \mu\text{g}$ de porfirinas/g hígado, mientras que TrCF con 2 mg/huevo causan diferentes grados de acumulación dependiendo de la posición de los sustituyentes en el anillo (desde $3,9 \pm 0,3$ a $6,8 \pm 1 \mu\text{g}$ porfiri

Fig. 21. Efecto de metabolitos bencénicos menos clorados en la acumulación de porfirinas hepáticas de embrión de pollo



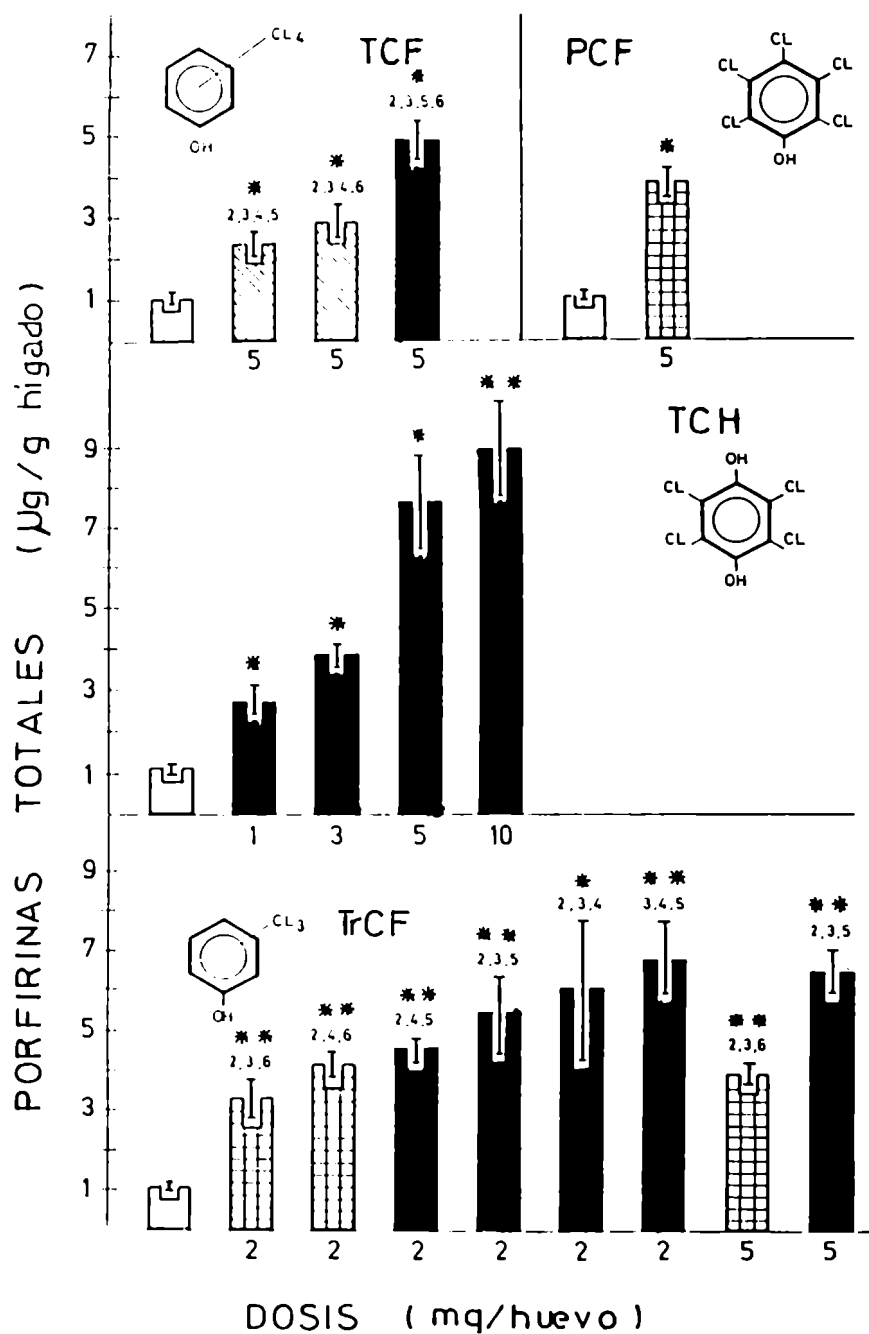
Sobre cada histograma se representa la estructura química de cada metabolito que se analizó a las dosis indicadas debajo. * $p < 0,05$ respecto de DMSO.

Fig. 22. Efecto de metabolitos azufrados en el contenido de porfirinas hepáticas de embrión de pollo.



Los detalles estan dados en Fig. 20 y 21. * p < 0,05 y ** p < 0,001 respecto de DMSO.

Fig. 23. Efecto de metabolitos fenólicos en el contenido de porfirinas hepáticas de embrión de pollo.



Sobre cada histograma se indica la posición de los sustituyentes de TCF y TrCF. Otros detalles están en Fig. 20 y 21. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ respecto de DMSO.

nas/g hígado). Con dosis de 5 mg/huevo 2,3,5-TrCF y 2,3,6-TrCF presentaron mayor respuesta, siendo el primero más efectivo a ambas dosis.

Entre los TCF ensayados el isómero 2,3,5,6-TcF mostró una mayor respuesta ($4,9 \pm 0,5$ μ g porfirinas/g hígado).

PCF, el principal metabolito del HCB produjo $3,9 \pm 0,5$ μ g de porfirinas/g hígado en dosis de 5 mg/huevo.

1.2.- Naturaleza de las porfirinas acumuladas en embrión de pollo por acción de metabolitos del HCB.

En la Tabla XI puede verse los porcentajes de porfirinas acumuladas por varios de los metabolitos del HCB. Los datos se presentan como el rango de valores obtenidos de 2 a 3 cromatografías, cada uno de estos datos se obtuvo haciendo un "pool" de hígados de dos embriones. Los embriones se incuban 24 hs. con cada droga antes de sacrificarlos. Las técnicas usadas fueron cromatografía en capa delgada (235) y cromatografía líquida de alta presión. En el caso del control con DMSO se informó el promedio obtenido de siete determinaciones realizadas cada una con un "pool" de hígados de 4 embriones.

Los resultados muestran que PCTF y PCTA-O₂ presentan un cuadro similar al DMSO. El PCF fué el que provocó la mayor acumulación de Uro. El resto presenta

TABLA XI. PORFIRINAS ACUMULADAS EN EMBRION DE POLLO POR ACCION DE METABOLITOS DEL HCB.

Droga	Porfirinas acumuladas						%	Furia	Uro
	Dosis mg	Proto	Copro	Penta	Hexa				
PCF	5	0	4-7	1-2	4-5		43-46	40-48	
2,3,5-TrCF	2	16-18	48-66	6-15	1-6		1-8	1-13	
3,4,5-TrCF	2	12-16	60-65	7-8	7-8		1-5	1-7	
TCH	1	0-2	74-78	5-11	5-6		5-6	3-5	
	3	2-4	56-58	6-8	7-9		10-12	9-11	
	5	23-28	52-57	6-14	0-5		0-11	1-3	
	7	5-32	50-68	4-16	0-9		0-9	0-8	
	10	4-12	88-96	0	0		0	0	
PCB	5	0-3	84-81	3-4	0-1		3-6	3-6	
PCTF	5	43-50	50-57	0	0		0	0	
PCTA-0	5	0-1	60-70	5-7	3-5		14-18	7-10	
PCTA-0 ₂	4	45-50	50-55	0	0		0	0	
FB	5	30-33	30-33	0-2	0-2		15-17	15-17	
FB + HCB	5 + 20	2-18	62-68	3-13	2-6		0,5-4	3-13	
DMSO	*	46 ⁺ 4	54 ⁺ 4	0	0		0	0	

Las drogas se inyectan disueltas en DMSO, salvo el FB que se disuelve en solución fisiológica.

una mayor acumulación de Copro a expensas de Proto, acumulando una gama variable de porfirinas de 5 a 8-COOH. TCH a altas concentraciones presentó menor acumulación de porfirinas más carboxiladas quizás porque a estas dosis la muerte de los embriones es muy rápida.

1.3.- Determinación de la actividad de ALA-S.

Como puede verse en la TABLA XII se realizaron las determinaciones de ALA-S en hígado de embriones de pollo de 17 días inyectados con los metabolitos del HCB. Para poder realizar este estudio hubo que ajustar las dosis y el tiempo de incubación con las drogas, tal que al menos de 4 a 8 embriones sobrevivan.

Los compuestos que presentaron inducción de ALA-S significativa respecto al control con DMSO fueron de naturaleza fenólica: 2,3,5,6-TCF, 2,3,4-2,3,6-, 3,4,5-TrCF y TCH. El resto no produjo ningún efecto.

2.- Efecto "in vitro" de metabolitos del HCB sobre la actividad PCL de hígado de rata.

Se examinó el efecto inhibitorio de los metabolitos del HCB en la actividad PCL hepática. Para ello se incubó citosol de hígado de rata normal en presencia de los metabolitos del HCB. Las drogas se disuelven en benceno o éter etílico, se adicionan a los tubos de Thunberg y se evapora el solvente. Los controles se realizan sin incluir

TABLA XII. EFECTOS DE METABOLITOS DEL HCB EN LA ACTIVIDAD DE ALA-S HEPATICA.

Droga	Dosis (mg)	Tiempo de Incubación	Actividad de ALA-S (nmol ALA/g/h)	Significancia
PCTF	0,5	2 hs	10 ± 2	--
PCTA-O ₂	1	1hs. 30 min.	4,0 ± 0,8	
	4	2hs.	6 ± 1	
TCTA	1	3hs.	4,5 ± 0,8	
PCTA	5	3hs.	4,5 ± 0,9	--
2,3,5,6-TCF	1	2hs.	9 ± 1	p < 0,05
2,3,4,5-TCF	1	2hs.	6,8 ± 0,7	--
2,3,4,6-TCF	1	2hs.	8 ± 1	
2,3,4-TrCF	1	1hs.	6 ± 3	
	1	2hs.	3 ± 1	--
2,3,6-TrCF	2	1hs. 30 min.	9 ± 1	p < 0,05
	2	1hs. 30 min.	20 ± 2	p < 0,001
3,4,5-TrCF	1	2hs.	9 ± 1	p < 0,02
	2	1hs. 30 min.	4 ± 1	--
2,4,5-TrCF	2	2hs.	9 ± 3	--
PCF	1	2hs.	6 ± 1	
		3hs.	5 ± 1	
TCH	0,5	1hs. 30 min.	7 ± 1	
		3hs.	8 ± 1	--
		6hs.	11 ± 2	p < 0,01
	1	1hs. 30 min.	8 ± 1	--
HCB	10	4hs.	6 ± 2	
1,2,3,4-TCB	5	3hs.	6 ± 2	
DMSO		1hs-5hs.	5 ± 1	

Las drogas se inyectan disueltas en 0,2 ml de DMSO, la actividad de ALA-S se determina según el método de Marver (236).

drogas en el medio de incubación. En el caso del HCB, se disuelve en 40 μ l de DMSO y el control respectivo se realiza con la misma cantidad de disolvente. La concentración en el medio de incubación fué de 0,1 mM para HCB y 1 mM para el resto.

Se analizó los productos de decarboxilación de la enzima como porcentaje de cada porfirina aislada del medio de incubación y se determinó actividad de primer etapa de decarboxilación (nmoles de porfirinas de 7- a 4-COOH/30 min/mg de proteínas) y de segunda etapa de decarboxilación (nmol Copro/30 min/mg de proteína).

Analizando el cuadro de distribución de porfirinas formadas a partir de Uro'gen Tabla XIII se observa que los controles contienen principalmente Hepta y Copro además de Uro, mientras que las porfirinas de 6 y 5-COOH se encontraron en menor cantidad. Bajo la influencia de TCH, Uro'gen se decarboxila a Hepta y Hexa, no detectandose las porfirinas menos carboxiladas. Evidentemente TCH ejerce un efecto inhibitorio distinto en la actividad PCL. En presencia de PCF, Uro'gen se convierte a Hepta y Hexa que predominan sobre las porfirinas de 5 a 4-COOH que se encuentran en menor proporción. Los otros compuestos no muestran influencia en el cuadro de distribución de porfirinas.

El grado de inhibición de la enzima para la primer etapa de decarboxilación fué de 64% para TCH y 25% para PCF. PCTF y 1,2,4,5-TCB mostraron efectos inhibitorios no significativos. Los otros compuestos no influenciaron la

TABLA XIII. EFECTO "IN VITRO" DE VARIOS METABOLITOS DEL HCB EN LA DECARBOXILACION DEL UROPORFIRINOGENO III.

Drogas	Porfirinas aisladas (%)				Actividad enzimática		Formación de Copro'gen (%)	Decremento de proteínas
	8-COOH	7-COOH	6-COOH	5-COOH	4-COOH	nmol porfirinas / 30 min		
Control	28	34	5	5	28	0,65	0,25	-
TCH	74	23	4	-	-	0,24	-	100
PCF	46	31	6	5	12	0,49	0,12	48
PCTF	33	33	5	4	25	0,60	0,23	8
ICTA	27	35	5	5	28	0,66	0,25	-
PCTA	28	34	5	5	28	0,65	0,25	-
PCTA-0	27	34	5	5	29	0,65	0,26	-
PCTA-0 ₂	27	33	6	6	28	0,66	0,25	-
1,2,3,5-TCB	28	34	7	6	25	0,65	0,23	8
1,2,4,5-TCB	33	31	5	4	27	0,60	0,25	-
1,2,3,4-TCB	28	34	5	5	28	0,65	0,25	-
PCB	28	34	5	5	28	0,65	0,25	-
DMSO	42	13	5	6	34	0,45	0,27	-
HCB	43	11	6	6	34	0,44	0,27	-

La mezcla de incubación contiene 2,2 µM de Uro'gen III, 9 mg de proteínas en un volumen final de 3 ml. La actividad enzimática se expresa como el promedio aritmético de 3 a 4 experimentos. La concentración final de drogas para HCB que fué de 0,1 mM. Los ensayos con HCB y su control DMSO fueron realizados en experimentos separados. (-) no se detectó. Las drogas fueron disueltas en benceno ó éter, salvo el HCB que fué disuelto en DMSO.

actividad enzimática.

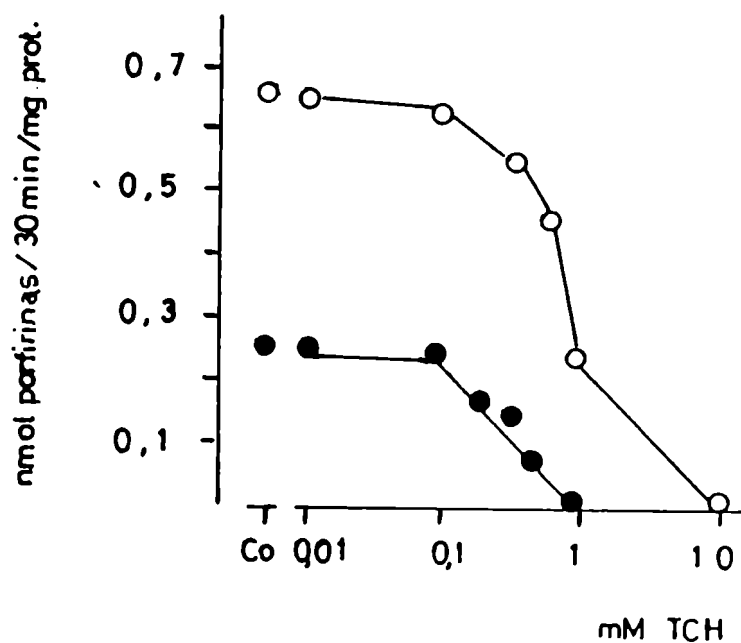
Respecto de la segunda etapa de decarboxilación TCH inhibe totalmente la formación de Copro, el PCF en un 48%, PCTF y 1,2,3,5-TCB mostraron muy poca influencia y el resto de los compuestos no tuvieron efecto.

Dado el mayor efecto inhibitorio de TCH se realizaron incubaciones con varias concentraciones de TCH (Fig. 24). TCH en concentraciones de 10^{-4} M ya ejerce una influencia significativa en la actividad enzimática, esto es formación de porfirinas de 7 a 4-COOH. A concentraciones de TCH de 10^{-2} M Uro'gen no es decarboxilado. Copro comienza a disminuir a 10^{-4} de TCH y es nula su formación a 10^{-3} M de TCH.

3.- Aislamiento y caracterización del inhibidor de PCL obtenido de hígado de ratas porfíricas.

Al iniciar este trabajo, la hipótesis que se había propuesto hasta ese momento y que estaba ampliamente aceptada, sobre el mecanismo de acción del HCB, era que estaba mediado por un metabolito reactivo del mismo, (173, 182, 206). Además los trabajos de Ríos de Molina y col. (205) que demostraron la existencia de un inhibidor termoestable en el hígado de ratas porfíricas, permitió suponer que estos hechos experimentales tenían alguna vinculación. Por este motivo, los objetivos fueron: 1) confirmar la presencia de dicho inhibidor, 2) aislar el inhibidor por medio de extracciones con los solventes usuales para aislar metabo-

Fig. 24. Efecto "in vitro" de TCH en la actividad de PCL de hígado de ratón.



El medio de incubación contiene 9 mg. de proteínas y 2,2 μ M de Uro'gen III. (O) primera etapa de decarboxilación, (●) segunda etapa de decarboxilación. Co-control sin TCH.

litos del HCB y caracterizarlo y 3) ver que relación existía entre el grado de porfiria de los animales y la capacidad de inhibir PCL normal del inhibidor extraído de los hígados respectivos. El grado de porfiria se evaluó midiendo la actividad PCL hepática de ratas intoxicadas con HCB durante distintos tiempos de drogado.

Para cumplimentar el primer objetivo se siguió la metodología empleada por Molina y col. (205) pero se trabajó con hígados perfundidos con solución fisiológica (paso 1, esquema I) para eliminar la posibilidad que el inhibidor proviniera de sangre, aunque este hecho era poco probable dado que en PCT experimental no se afecta la PCL sanguínea. Como puede verse en la Tabla XIV los extractos normales calentados, enteros o el sobrenadante de calentamiento, no tienen efecto en la actividad PCL normal. Los extractos obtenidos de hígado de ratas porfíricas enteros o el sobrenadante de calentamiento producen inhibición de la actividad PCL. El efecto de estas preparaciones en la PCL normal es menor que la disminución de PCL de la rata porfírica, a pesar que se incorpora al medio de incubación el equivalente a 1,5 ml de eluido de Sephadex G-25 y para analizar actividad de la enzima porfírica se utiliza 1 ml de dicho eluido, Esto implicaría que el inhibidor es sólo parcialmente termoestable o no es el único responsable de la disminución de PCL o que una vez separado de la enzima se modifica tal que no mantiene la misma reactividad, o no se logra separarlo totalmente de la proteína y unido no es reactivo.

ESQUEMA I. AISLACION DEL INHIBIDOR.

Rata intoxicada por HCB y Rata normal.

- 1) Perfusión del hígado con solución fisiológica.
- 2) Homogeneización con Gl. K O, 154 M.
- 3) Centrifugación a 10.000 xg 20 min. (N).
- 4) Filtración por Sephadex G-25.
Porfirinas (en el caso de ratas porfíricas).

Pico proteico

Calentar 100°C 5 min.

(N₉E, P₉E)

Centrifugar a 900 xg 5 min.

Sobrenadante (N₉ y P₉)

Ajuste a pH 1 con ClH concentrado

Centrifugación a 900 xg 5 min.

Sobrenadante ajustado a pH 6,8
(N_pH, P_pH)

TABLA XIV. EFECTO DE PREPARACIONES OBTENIDAS DE HIGADOS PORFIRICOS EN LA ACTIVIDAD PCL DE HIGADO DE RATAS NORMALES.

Preparación enzimática	Preparaciones de hígado calentados a 100°C 5 min(a).	A c t i v i d a d e n z i m á t i c a nmol porfirinas / 30 min / mg proteínas			
		Decarboxilación de Uro'gen	Decremento %	Formación de Copro'gen	Decremento %
N	-	0,690	-	0,185	-
N	QN _E	0,690	0	0,185	0
N	QN	0,690	0	0,185	0
P	-	0,110	84	0,002	99
N	QP _E	0,430	38	0,035	81
N	QP	0,430	38	0,035	81
	QN _E	0	100	0	100
	QN	0	100	0	100
	QP _E	0	100	0	100
	QP	0	100	0	100

(a) Se obtuvieron según el esquema 1, QN_e y QP_E, son las preparaciones desproteinizadas sin centrifugar, QN y QP son los sobrenadantes de las preparaciones calentadas. Los resultados presentados son representativos de 4 a 5 experiencias.

Se intentó desproteínizar ajustando el pH de los eluidos del Sephadex a 1, centrifugar, restaurar el pH al del medio de incubación y medir la actividad inhibitoria (esquema 1). Como puede verse en la Tabla V este tratamiento incrementa la capacidad inhibitoria. Si en lugar de calentar 5 min. a 100°C se calienta el eluido de Sephadex, 20 ó 30 min. disminuye la capacidad inhibitoria (Tabla XV). Podemos suponer entonces que el inhibidor es parcialmente termoes- table. La preincubación con la enzima 15 min. también mejora la capacidad inhibitoria (Tabla XV).

Por otro lado se observó que al aumentar la cantidad de inhibidor en el medio de incubación, aumentaba la inhibición de PCL normal (Fig. 25).

La inhibición producida por las preparaciones porfíricas dependen del grado de porfiria de los animales (Fig. 26), cuanto mayor es la reducción de la actividad PCL en las ratas porfíricas, mayor es la inhibición producida por la preparación calentada, obtenida de los hígados de dichas ratas, sobre la actividad PCL de hígado normal.

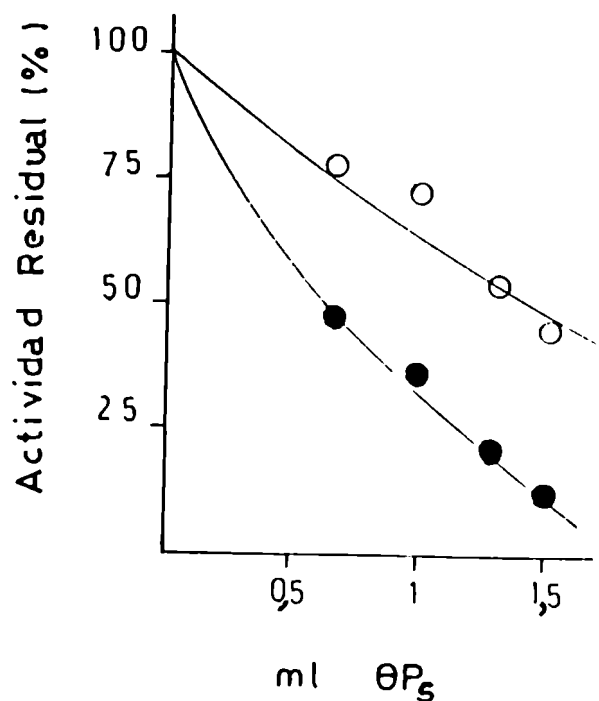
Se intentó entonces tratar de aislar, a partir de hígados porfíricos, el inhibidor por medio de extracciones con solventes (esquema II). Se parte siempre de los eluidos de Sephadex G-25, se desproteínizan por calentamiento o pH o se trabajan sin desproteínizar. Se fué variando el orden de extracción con los solventes, las cantidades de eluidos utilizados (de 4,5 ml a 20 ml). Las distintas fracciones orgánicas obtenidas se incuban para ver si tienen actividad

TABLA XV. EFECTO DE DISTINTOS TIEMPOS DE DESPROTEINIZACION, pH Y PREINCUBACION EN LA PREPARACION DEL INHIBIDOR.

Preparación enzimática	Preparación del inhibidor	Preincubación 15' con la enzima N	A c t i v i d a d e n z i m á t i c a nmol porfirinas / 30 min / mg proteínas			
			Decarboxilación de Uro'gen	Decremento %	Formación de Copro'gen	Decremento %
N			0,690		0,185	
N	NO _S		0,690		0,185	
N	PO _S		0,499	28	0,087	53
N	PO ₂₀		0,545	21	0,120	35
N	PO ₃₀		0,621	10	0,144	22
N	NpH		0,680		0,187	
N	PpH		0,285	58	0,037	88
N	NO _S		0,669		0,177	
N	PO _S		0,334	50	0,035	88

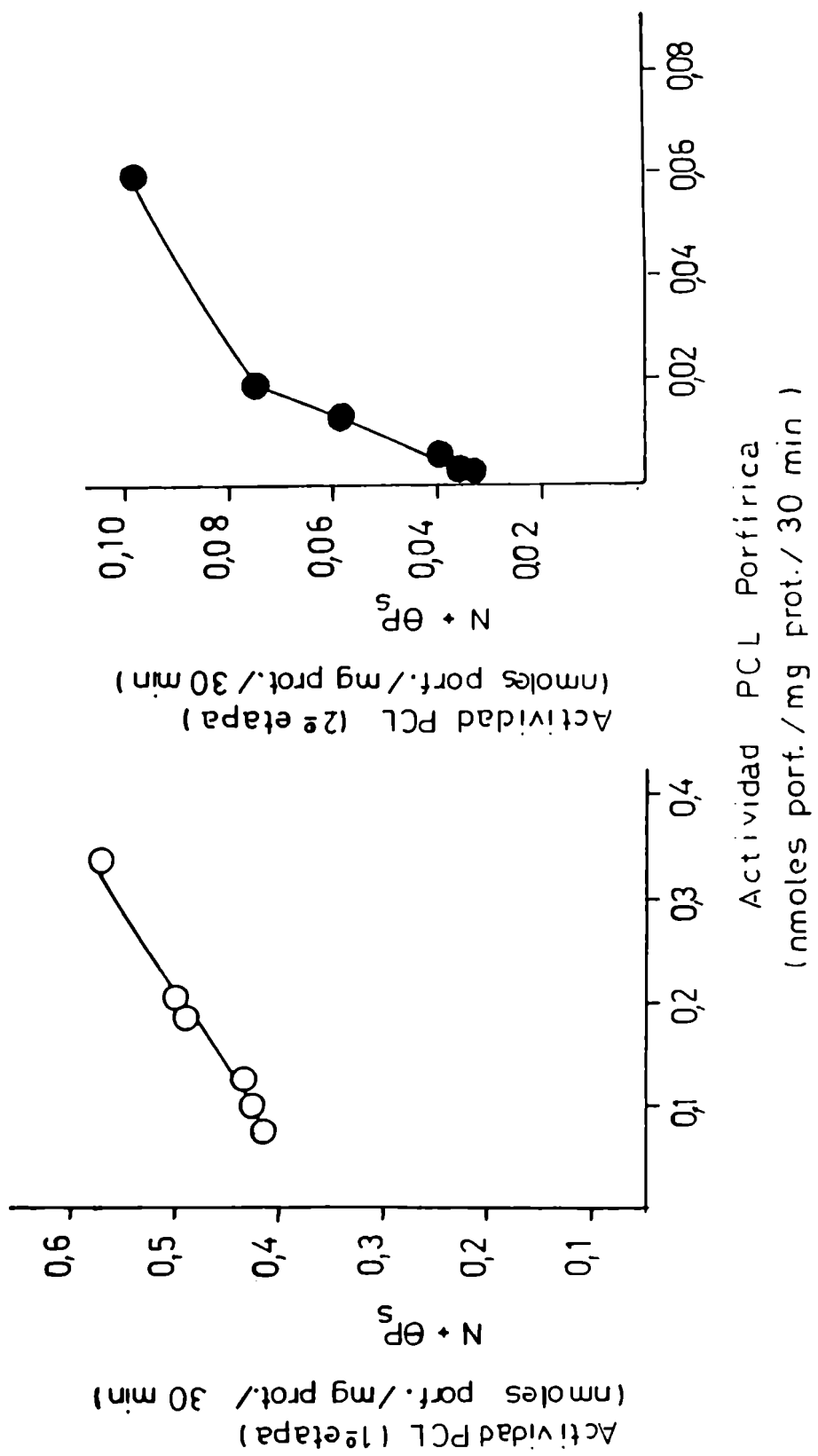
0_S, 20 y 30 son eluidos de Sephadex G-25 calentados 5, 20 y 30 min. a 100°C., NpH y PpH son eluidos de Sephadex G-25 ajustados a pH 1, centrifugados y restaurados su pH a 6,8. Los resultados presentados son el promedio aritmético de dos experiencias, donde se tuvo actividad inhibitoria semejante.

Fig. 25. Efecto de diferentes cantidades de sobrenadante de preparaciones porfíricas calentadas en la actividad PCL normal.



Las actividades relativas se expresan como porcentajes de la actividad específica de la enzima normal sin adiciones. (O) primera etapa: decarboxilación de Uro'gen; (●) segunda etapa: formación de Copro'gen; θP_5 sobrenadante de preparaciones porfíricas calentadas 5 min. a 100°C.

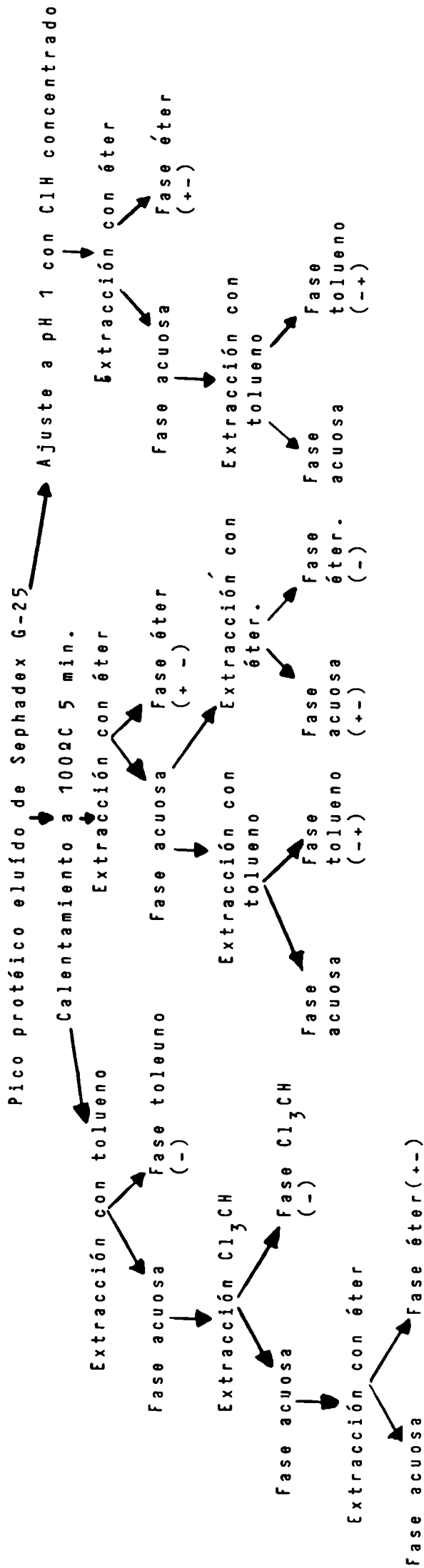
Fig. 26. Relación entre la capacidad inhibitoria de un hígado porfírico y su actividad PCL.



inhibitoria. En el esquema se indica con (+) cuando la fracción presenta actividad inhibitoria, (-) cuando no la tuvo, (+-) cuando en algunas experiencias presentó actividad inhibitoria y en otros no. En general a lo largo de varias experiencias, en la fase etérea la mayoría de las veces se encontró actividad inhibitoria. La fase tolueno la mayoría de las veces no dió actividad. La fase acuosa cuando no tuvo actividad, su correspondiente fase eterea sí la tenía. En todas las experiencias se trabajó paralelamente en igualdad de condiciones, preparaciones normales. Se intentó luego ver si los extractos etéreos con actividad inhibitoria, poseían algún tipo de compuesto de naturaleza semejante a metabolitos del HCB. Para ello se metilaron con diazometano y se corrieron en cromatografía gaseosa, con detector de captura electrónica, en condiciones tales que resuelve los metabolitos del HCB. No se pudo analizar el cromatograma dada la cantidad de picos presentes tanto en los extractos provenientes de animales intoxicados como en los normales, sin encontrarse diferencia entre ambos.

Se decidió cambiar la metodología, con el fin de lograr en forma repetitiva y consistente la aislación del inhibidor, paralelamente a purificarlo para poder caracterizarlo. Se utilizó entonces cromatografía en columnas de silica gel H (esquema III) se partió de 6 g de hígado normal y 6 g de hígado porfírico que se procesaron hasta obtener los eluidos proteicos de Sephadex G-25 (paso 4 esquema I) ajustados a pH 1 y centrifugados los cuales se liofilizaron previo a

E S Q U E M A I I .



(+) Significa que incubando el extracto correspondiente con PCL normal presentó actividad inhibitoria
 (-) Significa no presenta actividad inhibitoria, (+-) Significa que la mayoría de las veces presenta actividad inhibitoria y (-+) significa que la mayoría de las veces no presenta actividad inhibitoria.
 En todos los casos se evapora el solvente al aire o con N₂ previo a la adición de los demás componentes del medio de incubación.

ESQUEMA III.

Eluidos proteicos de Sephadex G-25



pH = 1 centrifugación



Liofilizado del sobrenadante



Columnas de sílica gel H

(con presión)



Elución: 1) Eter de petróleo (200 ml).

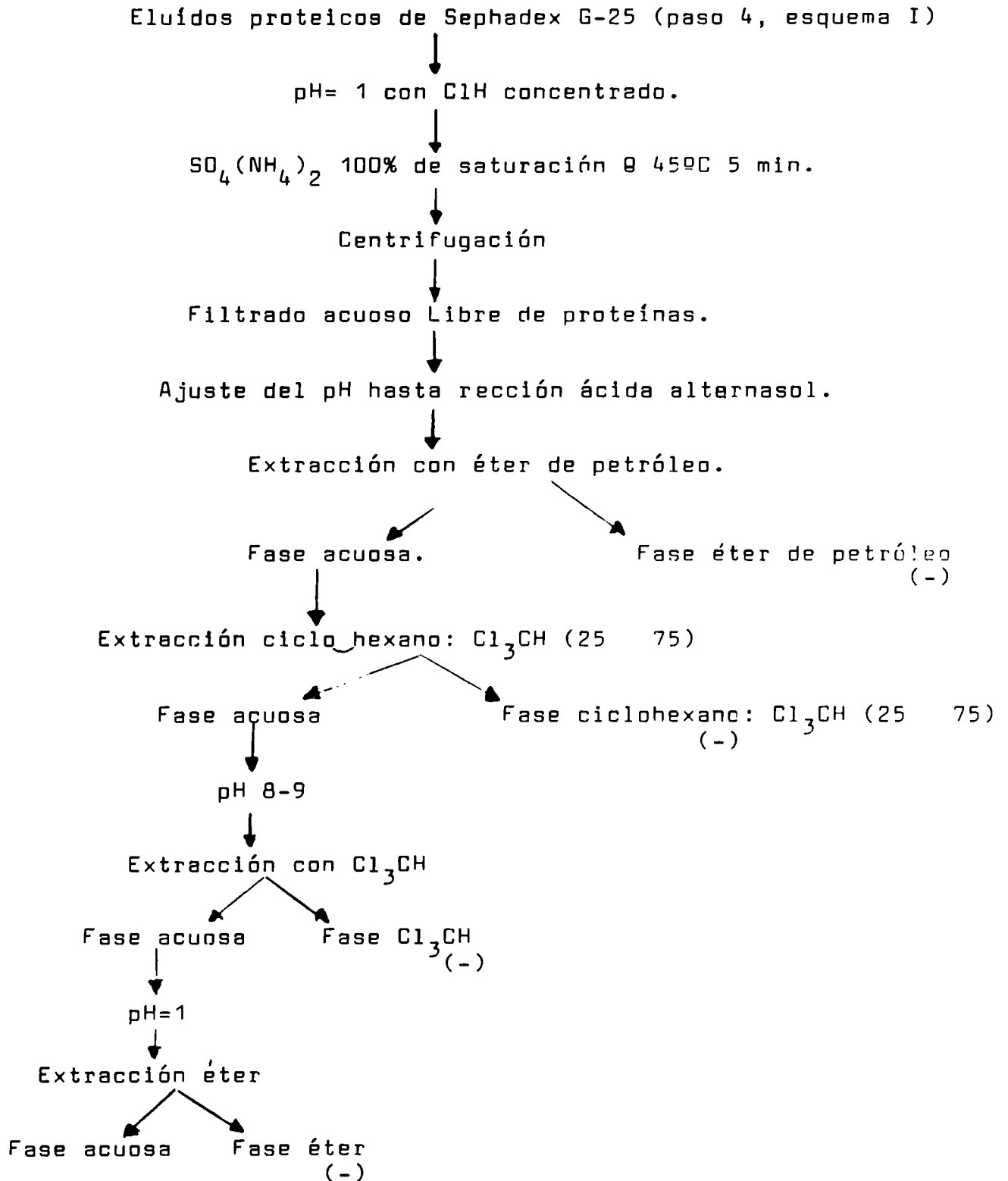
2) Eter de petróleo: Cl_2CH_2 (1:1) (300 ml).

3) Cl_2CH_2 (100 ml).

sembrarlos en las columnas. Se recogieron 50 fracciones en total de cada columna, que se cromatografiaron en placas de silicagel corridas con Cl_2CH_2 : éter de petróleo (1:1), revelando con luz U.V. y (SO_4H_2 : AcH). No se pudo encontrar analogía con los estándares de HCB, TCH, PCF y PCTF, así como tampoco diferencias entre las fracciones normales y porfíricas. Se midió la actividad inhibitoria sobre la PCL normal, para ello se hicieron "pooles" de las fracciones obtenidas. Solo un "pool" de fracciones porfíricas que corresponde a los eluidos de éter de petróleo: Cl_2CH_2 (1:1) presentó ligera actividad inhibitoria de la segunda etapa de decarboxilación. Se decidió probar entonces actividad inhibitoria en los liofilizados, encontrandose que tanto el normal como el porfírico destruían las porfirinas del medio de incubación.

Se aplicó entonces un método para extracción de venenos orgánicos no volátiles (254) con ligeras modificaciones esquema IV. Este método es de más rápido procesamiento que el anterior, se desproteíniza con sulfato de amonio a pH 1, calentando a 45°C 5 min. luego se realizan extracciones con solventes orgánicos en forma diferencial tal que se logran separar, plaguicidas, drogas ácidas, neutras y básicas. Dado que en las primeras experiencias (esquema II) el éter lograba muchos veces extraer el inhibidor se adicionó este paso como extracción final. Todas las fracciones se evaporaron y se midió actividad inhibitoria sobre PCL normal, ninguna fracción alteró la actividad enzimática normal.

ESQUEMA IV.



No pudiéndose aislar el inhibidor por estos sistemas que son adecuados para extraer compuestos de naturaleza semejante a los metabolitos del HCB, se dudó sobre la posible vinculación entre los metabolitos del HCB y el inhibidor, avalado por el hecho que en algunas oportunidades se encontró actividad inhibitoria en la fracción acuosa proveniente de preparaciones porfíricas. Se decidió entonces, precisar la naturaleza del inhibidor en cuanto a su polaridad, para ello se pasa sobrenadante de homogenato desproteínizado paso 3 esquema II por cartuchos de Sep-PAK rellenos con sílica gel que tiene unida cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos que le confieren a la matriz naturaleza no polar (esquema V) (207). Se eluye el inhibidor con buffer fosfato de potasio 0,134M pH 6,8 y se utiliza en el momento para medir actividad inhibitoria sobre PCL normal. Paralelamente se trabaja con preparaciones normales. En este sistema las porfirinas de las preparaciones provenientes de animales intoxicados quedan retenidas. El inhibidor obtenido por este procedimiento tiene actividad (Tabla XVI). Es de destacar que primero se desproteíniza o sea que lo atravieca el cartucho es el inhibidor libre y no se pega, mientras que las porfirinas sí lo hacen, o sea que el inhibidor tendría una polaridad mayor que las porfirinas que son despegadas con metanol.

Cabe señalar que el grado de inhibición logrado varía de una experiencia a otra como consecuencia de haber usado preparaciones provenientes de animales intoxicados distintos (Fig. 25).

ESQUEMA V.

Sobrenadante de 10.000 xg 20 min. (paso 3 esquema I)



Calentamiento 5 min. a 90°C.



Centrifugación 900 xg 5 min.



1 ml. de sobrenadante

Sep-PAK C₁₈



Eluidos con buffer fosfato de potasio

0,134 M pH 6,8 sin Fluorescencia

N_S y P_S

TABLA XVI. USO DE SEP-PAK EN LA PREPARACION DEL INHIBIDOR.

Preparación Enzimática	Preparación del Inhibidor.	Actividad Enzimática		Enzimática	
		nmol porfirina / Decarboxilación de Uro'gen.	/ 30 min / Decremento (%)	mg prot. / Formación de Copro' gen.	/ Decremento (%)
N	-	0,690	-	0,185	-
N	N _{pH}	0,730	-	0,190	-
N	P _{pH}	0,476	31	0,109	41
N	N ₀	0,695	-	0,186	-
N	P ₀	0,507	22	0,133	28
N	N _S	0,690	-	0,185	-
N	P _S	0,524	24	0,120	35

N y P_{pH}: corresponde a eluidos de Sephadex G-25 ajustado a pH 1 con ClH concentrado, centrifugado a 900 xg 5 min. Se incuba lo equivalente a 1,5 ml de eluido de la columna de Sephadex. N y P₀, son los eluidos de Sephadex G-25 calentados 5 min. a 100°C, se incuba lo equivalente a 1,5 ml de eluido.

N_S y P_S: son los sobrenadantes de centrifugación del homogenato calentados 5 min. a 90°C, sembrados (1 ml) en cartuchos de SEP-PAK C₁₈, eluidos con 3 ml buffer fosfato 0,134 M pH 6,8, el volumen incubado fue entre 1,5 a 1,6 ml que representa una cantidad aproximadamente equivalente de sobrenadante de homogenato, a la incubada en los otros casos.

DISCUSION.

Con respecto al efecto "in ovo" de los metabolitos del HCB los resultados presentados están de acuerdo con las observaciones previas (173, 180, 182, 193, 196) respecto a la metabolización del HCB como un requisito para que desarrolle su acción porfirinogénica, como pudo observarse por el pretratamiento con FB. Sin embargo cabe señalar que las nuevas teorías respecto al mecanismo de acción del HCB sugieren que este compuesto u otros con actividad porfirinogénica actuarían por un mecanismo común que implica la formación de especies reactivas ya sea por un desacople de la cadena de transporte de electrones microsomal, de la función monooxigenasa del sistema metabolizante de drogas, dada la lenta metabolización de estos compuestos o por estimulación de la formación de Fe^{2+} y sus consiguientes efectos tóxicos (207, 223, 224). En estos procesos estarían involucrados el agente porfirinogénico, el sistema metabolizante de drogas y el Fe. Esto viene a colación del efecto porfirinogénico del FB "per se", en este sistema experimental, en particular el FB podría desatar alguno de los procesos antes mencionados y el HCB en sí funcionaría sinérgicamente con el FB.

El HCB "in ovo" no pudo alterar el metabolismo del hemo, sin embargo se ha reportado que en cultivo de células de embrión de pollo causa un incremento de 10 veces en el contenido de porfirinas (193).

Entre los metabolitos del HCB ensayados benéficos,

azufrados y fenólicos, varios fueron capaces de producir acumulación de porfirinas en diferente grado.

Los bencénicos tuvieron pobre capacidad para inducir acumulación de porfirinas comparado con los otros metabolitos. El comportamiento diferencial del 1,2,3,4- y 1,2,4,5-TCB está de acuerdo con los resultados de Rimington y Ziegler (203) en ratas que mostraron mayor efecto para el primer isómero.

Respecto de los metabolitos azufrados como inductores de acumulación de porfirinas, funcionarían con menor efecto respecto a los fenólicos. Debets y col. (193) trabajando en cultivo de células de embrión de pollo reportaron que sólo PCTA y TCTA fueron capaces de producir acumulación de porfirinas y PCTF no tuvo efecto. Sin embargo PCTF fué el que "in ovo" produjo mayor acumulación que los anisoles. Koss y col. (255 y 256) trabajando en ratas no encontraron efecto de PCTF, PCTA, PCTA-O y PCTA-O₂ pero la administración simultánea de ALA y PCTF promovió un incremento en la acumulación de porfirinas.

Los compuestos fenólicos se comportaron como fuertes inductores de acumulación de porfirinas. PCF el principal metabolito del HCB, no induce porfiria en ratas hembras (200, 201) sin embargo acelera el establecimiento de porfiria por HCB cuando ambas drogas se administran juntas (202). En este trabajo el PCF fué capaz de producir un incremento de 3,5 veces en el contenido de porfirinas que está de acuerdo con los resultados reportados anteriormente (201). Respec-

to a la acción remarcable de TCH no concuerda con la falta de acción reportada por Debets y col. (193) en cultivo.

En línea general las diferencias encontradas entre los resultados presentados en este trabajo y los de Debets y col. (193) podrían atribuirse a: a) el diferente modelo experimental "in ovo" en el presente trabajo y en cultivo de hepatocitos de embrión de pollo en caso de Debets (193) donde la accesibilidad de las drogas para llegar a los hepatocitos es diferente, b) la diferente cepa de embriones de pollo usada, con la consecuente diferencia en el sistema metabolizante de drogas (257), c) las distintas dosis empleadas.

Los resultados obtenidos indican que: a) el HCB no fué capaz de producir acumulación de porfirinas "per se", b) muchos de los metabolitos del HCB probados fueron inductores mostrando un efecto diferencial según la naturaleza de los compuestos, así el orden de reactividad fué fenólicos > azufrados > bencénicos y c) El FB que no es un hidrocarburo aromático halogenado pudo "per se" alterar el contenido de porfirinas.

De todos los perfiles de acumulación presentados el PCF es el único que podría quizás adjudicarse una disminución de PCL. Debets y col. (193) encuentran un perfil alterado con acumulación predominante de Uro en cultivos tratados con HCB + β -naftoflavona. Con PCTA y TCTA obtienen un cuadro normal que se altera por β -naftoflavona. Es remarkable que el FB no sólo produce acumulación de porfirinas

sino que también la naturaleza de las mismas está alterada. Hallazgos similares fueron informados por Ferioli y col. (225) Lyon y col. (258) y Simbir y col. (259), trabajando en cultivo de células de embrión de pollo; incluso estos últimos miden actividad PCL encontrándola disminuida. Es de destacar también que incluso HCB + FB presenta menor acumulación de porfirinas de 7 y 8-COOH respecto a FB sólo.

Respecto a la inducción de la enzima ALA-S salvo algunos compuestos fenólicos, los otros no pudieron inducir la enzima reguladora, evidentemente no bloquearon el camino metabólico en grado tal de deplejar la cantidad de hemo como para inducir la ALA-S. Cabe mencionar que la rápida muerte de los animales podría no dar tiempo suficiente para desregular el sistema e inducir la enzima. Evidentemente estas drogas causaron otros efectos tóxicos severos quizás los responsables de las muertes, además de alterar en distintos niveles el camino biosintético, así el isómero 2,3,6-Tr CF fué el que causó menor acumulación de porfirinas, sin embargo fué el que produjo mayor inducción de la enzima. Wainstok y col. (201) informan que el PCF en dosis superiores a las usadas en este trabajo logra inducir la actividad de ALA-S, Carpenter y col. (260) reportaron que TCH sólo no induce esta enzima en codornices.

Respecto al efecto "in vitro" de los metabolitos sobre la PCL hepática los resultados muestran un fuerte efecto inhibitorio de los compuestos fenólicos, obviamente la influencia de estos compuestos se basan en las propiedades

de sus grupos OH.

Estudios "in vitro" revelaron que los clorofenoles se unen a las proteínas enzimáticas, disminuyendo sus actividades catalíticas (261). Intentos de aislar clorofenoles de soluciones conteniendo proteínas resultan en pobres recuperaciones. Se ha concluido que ocurre unión covalente entre estas sustancias y las proteínas (262). Un interrogante queda planteado acerca del tipo de estructura protéica que une a los fenoles y si lo hacen en forma disociada, o no disociada.

El comparativamente mayor efecto inhibitorio de TCH debe depender de su capacidad de convertirse en semiquinona y quinona (263); en este proceso se forma radical semiquinona que se une a GSH y proteínas (264). No se puede descartar que este proceso redox altere la decarboxilación del Uro'gen. Carpenter y col. (260) demostraron que TCH administrada a animales pretratado con HCB causaron una porfiria más severa que HCB sólo. Ciertamente las concentraciones de TCH en estos estudios fueron superiores a las halladas en animales tratados con HCB por largos tiempos, sin embargo en los experimentos a largo plazo, bajas concentraciones de TCH presentes en forma continua en el hígado, deben de ser tan efectivas como altas concentraciones por cortos períodos.

Ríos de Molina y col. (205) realizaron experiencias similares a las aquí presentadas, encontrando para tri- y tetra- clorofenoles inhibiciones de 26 a 52% y de 60 a 83% para primera y segunda etapa de decarboxilación de PCL res-

pectivamente.

A diferencia de los hallazgos de Kawanishi y col. (92) HCB "in vitro" no tuvo efecto en la actividad PCL. Como se ha visto en la Tabla XIII los bencenos y HCB tienen poca o ninguna capacidad de alterar la enzima quizás debido a la baja reactividad de estas moléculas .

Presumiblemente el HCB administrado a animales, al llegar al hígado sufre activación metabólica tal que alguna forma reactiva se una o altere la PCL pero dado que el PCF no es porfirinogénico en ratas (175, 176) el verdadero responsable debe ser un intermediario entre HCB y PCF o especies activas de O_2 o formación de un inhibidor con características comunes a todas las drogas con capacidad de actuar igual que HCB, o sea que fundamentalmente su acción se basa en disminuir la PCL. Paralelamente a la acción de estos supuestos metabolitos reactivos o inhibidor o especies activas de oxígeno, los productos metabólicos del fungicida de naturaleza fenólica que se acumulan en el hígado, podrían en conjunto ser un factor más que contribuya a la disminución de la PCL.

Respecto al inhibidor de PCL los resultados presentados avalan la existencia del mismo, formado en el hígado de ratas porfíricas por HCB. Este inhibidor tiene más actividad cuanto más porfíricas están las ratas de las cuales se obtienen. Respecto a la estabilidad a la temperatura, se comporta como parcialmente termoestable. No se pudo encontrar a través de métodos orgánicos un camino adecuado para aislarlo. En este sentido Smith y Francis (207) informan que no pudieron aislar el

inhibidor por extracción con acetato de etilo o éter. Las experiencias con Sep Pak presentan un panorama distinto respecto a la polaridad esperada del inhibidor, pues a juzgar por este hecho sería de naturaleza polar coincidiendo con los resultados de Smith y Francis (207). Estos autores reportan la formación del inhibidor en ratones porfíricos por HCB pero con sobrecarga de Fe, siendo que ni HCB ni Fe sólo pueden producir su formación. También encuentran el inhibidor en ratones porfíricos por: 2,3,7,9-tetraclorodibenzo-p-dioxina, Aroclor 1,2,5,4, firemaster BP-6, 2,3,4,2',3',4'-hexaclorobifenilo, hexabromobenceno y 2,4,5,2',4',5'-hexaclorobifenilo. Ellos encuentran un paralelismo entre la actividad inhibitoria y la disminución de PCL de los animales intoxicados como en el presente trabajo. Una observación muy importante que hacen es que si fotooxidan la PCL no pueden detectar actividad inhibitoria. Cantoni y col. (206) reportan que ratones porfíricos con tetraclorodibenzo-p-dioxina producen un inhibidor de PCL normal, la inhibición producida por el mismo, no es reversible por diálisis y no es competitiva.

Resumiendo, se confirma la formación de un inhibidor en animales porfíricos por HCB, cuya capacidad inhibitoria o cantidad se incrementa con el grado de porfiria de los animales. Hasta el presente no se lo ha podido caracterizar, sí se tienen indicios de su polaridad, que haría suponer que no está relacionado con metabolitos del HCB, pues resultó más polar que las porfirinas presentes en el hígado del animal intoxicado. Este inhibidor podría avalar un mecanismo común

para todas las drogas porfirinogénicas, con tan diversas estructuras. Dicho inhibidor podría formarse por interacción de las drogas con el sistema metabolizante y el Fe, pudiendo de esta manera justificar el por qué en embrión de pollo y en cultivo el FB resultó uroporfirinogénico.

C A P I T U L O I I I .

"ESTUDIOS TENDIENTES A ELUCIDAR EL MECANISMO DE ACCION DEL HCB".

B. "EFECTOS DE UN QUELANTE DE HIERRO EN LA PORFIRIA EXPERIMENTAL.

La desferrioxamina (DF) tiene una alta afinidad por iones férricos y es usada en terapia clínica como un quelantes específicos de hierro (265, 266, 267, 268). Este quelante decrece la ferritina sérica y la concentración de hierro en hígado (266) incrementando el hierro en orina (269) en humanos.

Ratas tratadas con HCB tienen un contenido de hierro total hepático mayor que las normales (220, 221, 270, 271). La producción de porfiria (218) y la inhibición de PCL por administración de HCB se incrementan y aceleran cuando los animales están previamente sideróticos. La siderosis por sí sola no produce la inhibición de esta enzima (103, 219).

Los quelantes de hierro previenen la acumulación de Uro cuando se exp_onen hepatocitos a compuestos cíclicos halogenados (198). Sin embargo, Sinclair y col. (272) demuestran que los quelantes actuarían en cultivo de células inhibiendo la síntesis del citocromo P-448 dado que DF previene la acumulación de Uro por bifenilo policlorado en células intactas pero no en los cultivos pretratados con 3-metilcolantreno.

DF potencia la inducción de ALA-S promovida por AIA en cultivo de células de embrión de pollo (10, 198) pero

en ratas no tiene efecto sinérgico en la inducción de esta enzima por tratamiento con AIA Y DDC (273), DF inhibe la actividad de ferroquelatasa (10, 198, 273), estimula la actividad de hemooxigenasa (273) y disminuye el citocromo P-450 (273,274). Produce en algunos casos acumulación de porfirinas (10, 198) pero no induce ALA-S, en cultivo de células de embrión de pollo o hígado de rata (273, 274).

Para investigar el rol del hierro en la porfiria experimental por HCB en ratas, se diseñaron dos experiencias, la primera de ellas fué ver qué pasaba con el establecimiento de porfiria por HCB cuando a los animales se le suministrasimultáneamente DF. La segunda consistió en administrar el quelante de Fe una vez establecida la porfiria.

1.- Efecto de DF en el desarrollo de la porfiria inducida por HCB.

1.1.- Diseño experimental. Los animales se dividieron en cuatro grupos de 12 animales cada uno: (1) normal (N) que son los controles sin tratamiento, (2) ratas tratadas con DF 3 veces por semana, reciben inyecciones intramusculares de DF de 100 mg/kg de peso, (3) ratas tratadas con HCB, 1 g/kg peso diariamente por sonda gástrica, (4) ratas tratadas con DF y HCB. DF fué administrado desde el comienzo del experimento. Los animales fueron sacrificados después de 12-14 semanas de tratamiento. Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis dado que los datos no seguían una distribución normal.

1.2. Resultados.

a) Excreción urinaria de precursores y porfirinas.

Se determinaron los contenidos urinarios de ALA, PBG y porfirinas semanalmente, en muestras de orina de 24 hs. para los cuatro lotes de animales (normal: N, desferrioxamina: DF, hexaclorobenceno: HCB y HCB + DF). El fin fué determinar los tiempos relativos del establecimiento de porfiria. Los resultados obtenidos pueden verse en la Fig. 27 donde se grafican las excreciones en función del tiempo de drogado. Cada punto representa excreciones de ratas individuales y representativas de cada grupo.

DF no modifica la excreción normal de ALA (23 $\mu\text{g}/24$ hs), PBG (8,6 $\mu\text{g}/24$ hs.) y porfirinas totales (2,2 $\mu\text{g}/24$ hs.). El rango de estas excreciones normales es el siguiente (13,1 - 32,0), (2,3 - 9,0) y (1,0 - 2,3) $\mu\text{g}/24$ hs. respectivamente.

En ratas tratadas con HCB solamente los niveles urinarios de ALA y PBG se incrementan en comparación con los normales en la semana 8, alcanzando en la semana 12 valores de 90 $\mu\text{g}/24$ hs. y 800 $\mu\text{g}/24$ hs. respectivamente. Las porfirinas en estos animales ya se incrementaron en la semana 6, alcanzando una excreción de 140 $\mu\text{g}/24$ hs. en la semana 12.

Los animales que recibieron el quelante más HCB mostraron excreciones normales elevándose ligeramente hacia el final de 14 semanas (Fig. 27). Las porfirinas comienzan a incrementarse en la semana 10 y salvo un caso que alcanzó valores de 50 $\mu\text{g}/24$ hs., el resto de animales de este lote no superó los 10 ó 20 $\mu\text{g}/24$ hs.

Fig.27. Excreción urinaria de ALA, PBG y porfirinas totales.

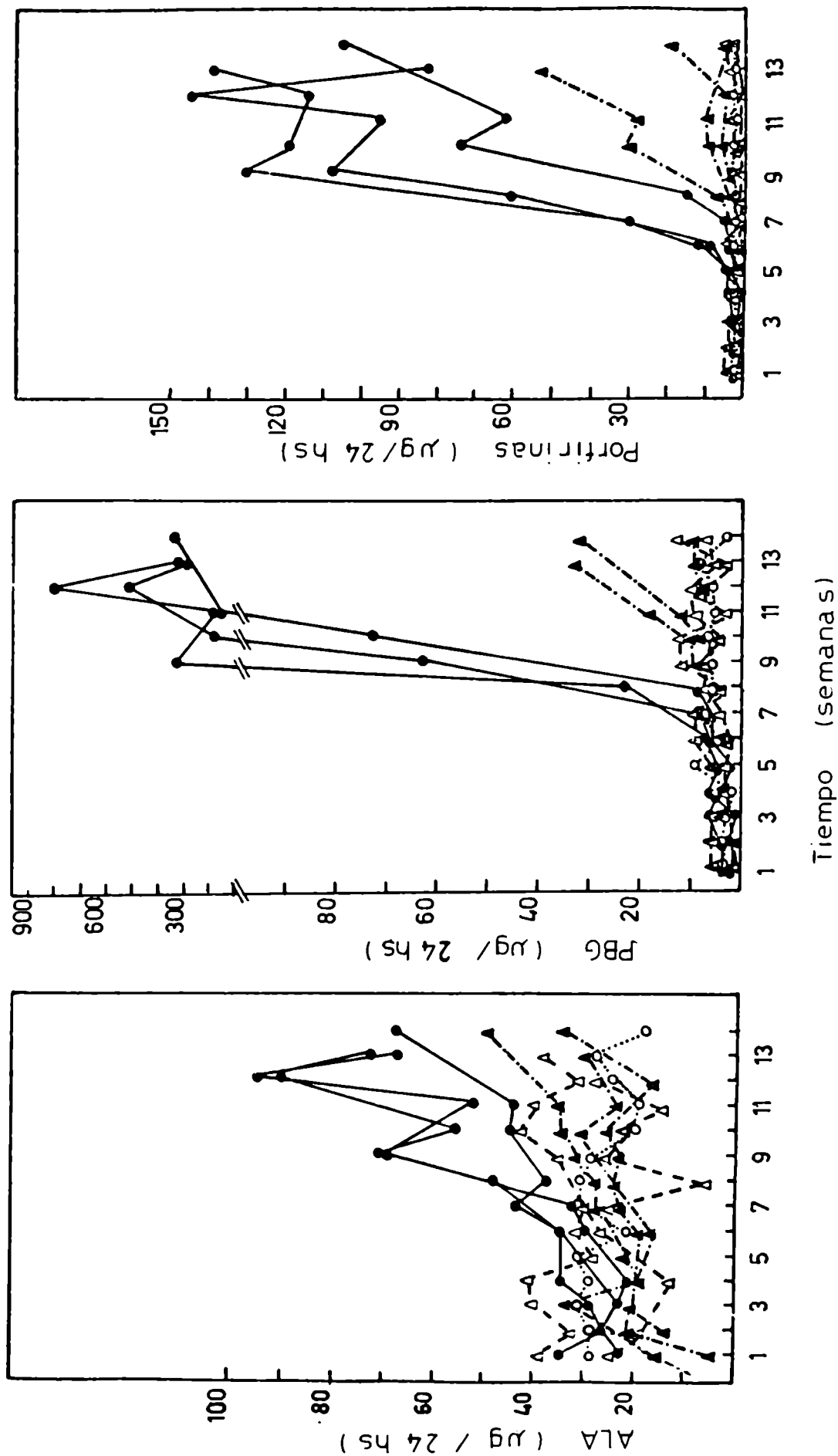


Fig. 27. Cada punto representa las excreciones urinarias de ratas individuales y representativas de cada lote de animales tratados con (●) HCB, (▲) HCB + DF, (△) DF y el valor promedio de cinco ratas normales (○).

En cuanto a la evaluación de estos parámetros se pudo observar que el lote de animales que recibió el quelante de Fe junto al HCB presentó excreciones de ALA y PBG normales hasta casi el final del tratamiento y las porfirinas se empiezan a incrementar 4 semanas después y no llegan a excretar los altos valores de porfirinas que excretan los animales que sólo recibieron el fungicida. Los animales que sólo reciben el quelante no modifican los parámetros normales.

b) Relación peso del hígado a peso del cuerpo.

En el momento de sacrificar los animales (12 y 14 semanas) se determinó este cociente obteniéndose los siguientes valores 0,040 para normales, 0,043 para DF y 0,054 para HCB y HCB + DF.

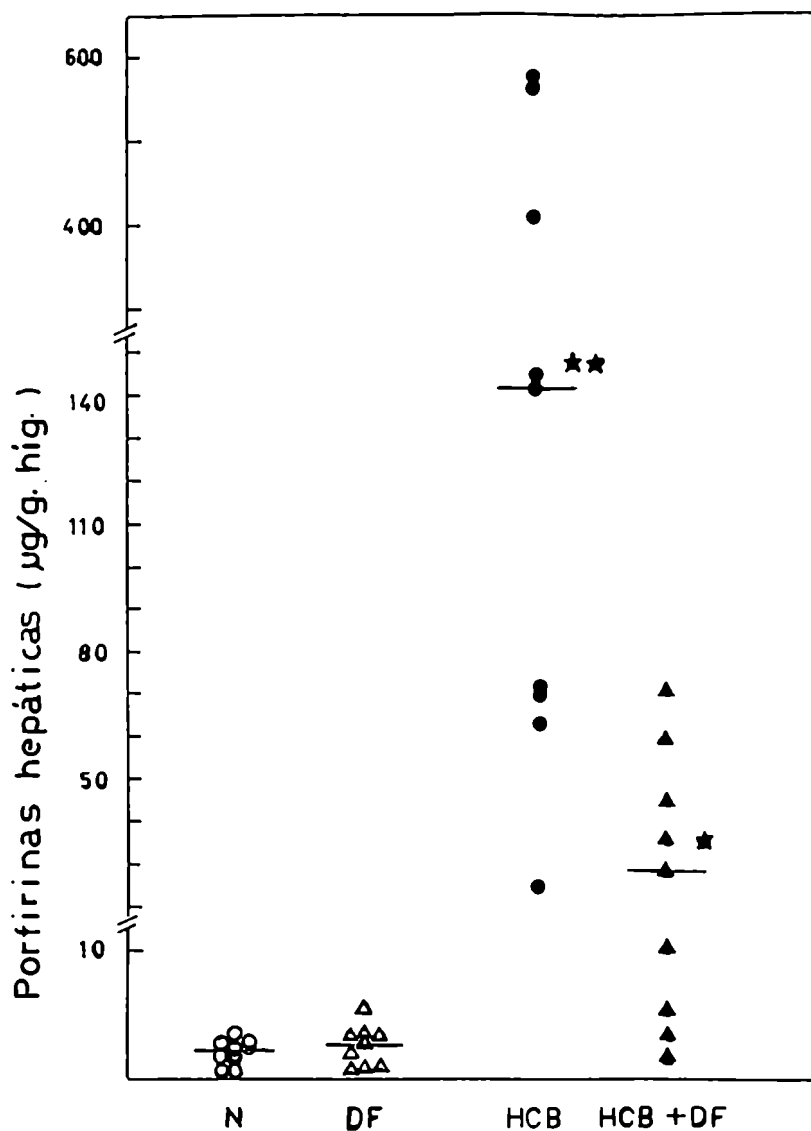
c) Acumulación de porfirinas hepáticas.

Como puede verse en la Fig. 28, los lotes normales y tratados con DF no presentan diferencias significativas. El HCB produce un incremento de 56 veces en el contenido hepático de porfirinas ($p < 0,005$ respecto al normal). La administración conjunta del quelante y el fungicida disminuye significativamente la cantidad de porfirinas acumuladas por el HCB solo ($p < 0,01$).

d) Actividad enzimática de ALA-S.

El tratamiento con sólo DF no afecta la actividad de ésta enzima (Fig. 29), el HCB induce la actividad de esta enzima significativamente ($p < 0,005$), y la administración

Fig. 28. Efecto del tratamiento con DF en el contenido hepático de porfirinas producido por HCB.



Las ratas se sacrifican entre 12 y 14 semanas de tratamiento, se remueven los hígados y se extraen las porfirinas. Cada punto representa el valor individual de cada animal para cada lote: HCB(●), HCB + DF (▲), DF (△) y normales (○). (—) valor de la mediana. * $p < 0,01$ respecto del grupo HCB; ** $p < 0,005$ respecto del grupo normal.

conjunta de DF y HCB disminuye significativamente la inducción producida por el fungicida ($p < 0,005$)

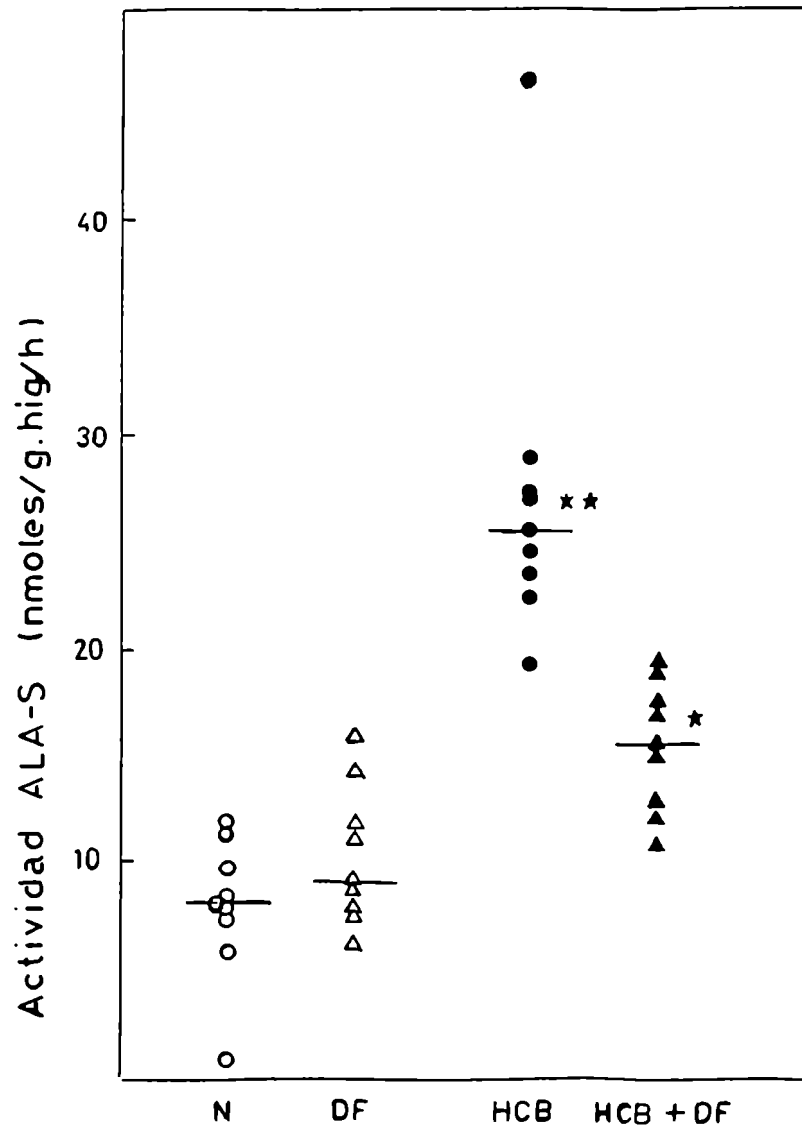
e) Actividad enzimática de PCL.

DF no afecta la actividad de esta enzima en ambas etapas de decarboxilación (Fig. 30). El HCB disminuye significativamente ($p < 0,005$) y drásticamente la actividad en un 55% la primer etapa de decarboxilación y un 98% la segunda. El lote de animales que recibió el quelante y el fungicida presentó sólo disminuciones del 22 y 60% para primera y segunda etapa de decarboxilación respectivamente siendo esta protección ejercida por el quelante significativa ($p < 0,025$) respecto al lote de animales que recibió sólo el fungicida.

f) Efecto "in vitro" de DF en las actividades enzimáticas.

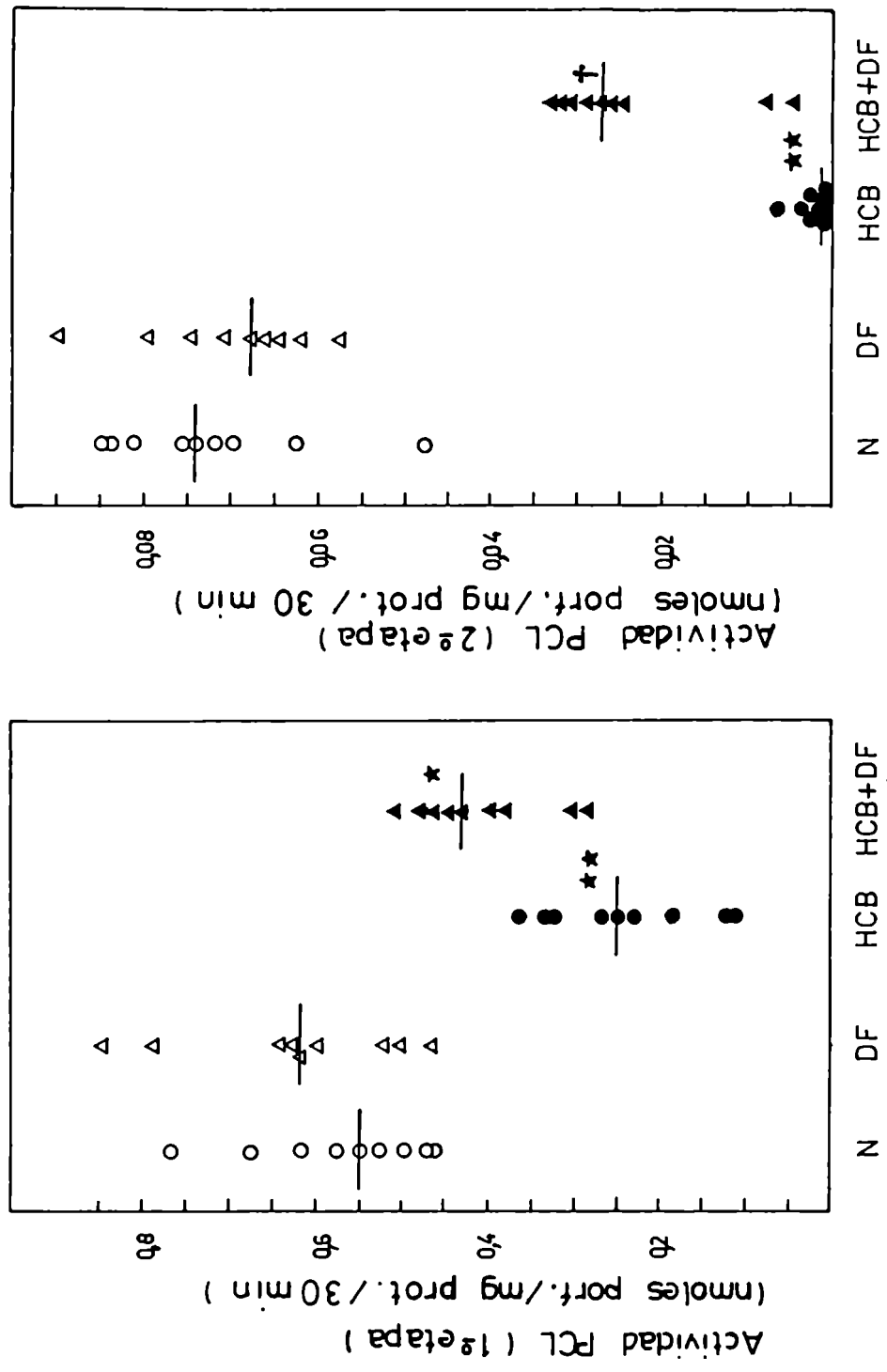
DF en concentraciones de 10^{-2} y 10^{-3} M no tuvo efecto "in vitro" en las actividades hepáticas de ALA-S y PCL de animales normales y porfíricos (Tabla XVII).

Fig. 29. Efecto de DF en la incrementada actividad de ALA-S causada por HCB.



Las ratas fueron sacrificadas entre las semanas 12 y 14 de tratamiento. Las actividades enzimáticas se midieron según se detalla en Métodos. Cada punto representa el valor individual de cada animal para cada lote: HCB (●), HCB + DF (▲), DF (△) y normal (○). (—) valor de la mediana * $p < 0,005$ respecto del grupo HCB y ** $p < 0,005$ respecto del grupo N.

Fig. 30. Efecto de DF en la disminución de PCL debida al HCB.



Las ratas se sacrificaron en las semanas 12 a 14 de tratamiento. Las actividades enzimáticas se midieron según se detalla en métodos. Cada punto representa el valor individual correspondiente a cada animal de cada lote HCB (●), DF (▲) y normal. (○) valor de la mediana (←) *p < 0,025 respecto del grupo HCB, **p < 0,005 respecto del grupo N, †p < 0,005 respecto del grupo HCB.

TABLA XVII. ADICION DE DF AL MEDIO DE INCUBACION DE ALA-S Y PCL.

Preparación enzimática.	DF mM	A L A - S		P C L	
		nmoles de ALA/g hígado/h	nmoles de porfirinas/mg proteínas/30 min. Primer etapa	Segunda etapa	
Normal		11,8	0,626	0,084	
	1	9,1	0,634	0,078	
	10	11,3	0,621	0,077	
Porfírica		46,2	0,251	0,002	
	1	48,4	0,256	0,002	
	10	42,6	0,262	0,002	

La DF fué adicionada en solución acuosa tal que se obtuvieron las concentraciones indicadas en el medio de incubación. Cada valor representa el promedio de dos experimentos realizados por duplicado.

2.- Evaluación de la capacidad de la desferrioxamina para revertir una severa porfiria inducida por hexaclorobenceno.

2.1.- Diseño experimental: Se trabajó con 4 lotes de seis animales cada uno: (1) normal (N) que son los controles sin tratamiento, (2) ratas tratadas con desferrioxamina (DF) tres veces por semana por inyección intramuscular (100 mg/kg de peso del animal) durante 10 semanas (3) tratadas con HCB diariamente, administrado por sonda gástrica (1 g/kg de peso del animal durante 27 semanas y (4) ratas tratadas con HCB como en (3) pero cuando se establece una severa porfiria (17 semanas de tratamiento) se administra DF como en (2) junto con el fungicida durante 10 semanas. Los animales se sacrificaron en la semana 27.

Se aplicó el "test" no paramétrico de Kruskal Wallis, dado que los datos no presentan una distribución normal.

2.2- Resultados.

Se comenzó el experimento con dos lotes de animales N y HCB. Después de 4 meses de drogado los animales del lote HCB mostraban una porfiria definida. Esto se evaluó a través de la cuantificación de ALA, PBG y porfirinas en orina, la que ya exhibía intensas bandas de absorción en el visible al ser observada espectroscópicamente. En esta etapa del experimento la mitad de los animales de cada lote comenzó a recibir DF. Así se obtuvo los cuatro grupos: N, DF, HCB y HCB + DF.

a) Excreción urinaria de precursores y porfirinas.

En la Fig. 31, se grafican las determinaciones de ALA, PBG y porfirinas en orina de 24 hs. Por claridad del gráfico sólo se muestran los datos obtenidos semana por medio y a partir de la 7ma. semana. Hasta la 7ma. semana los valores difirieron poco respecto a los normales.

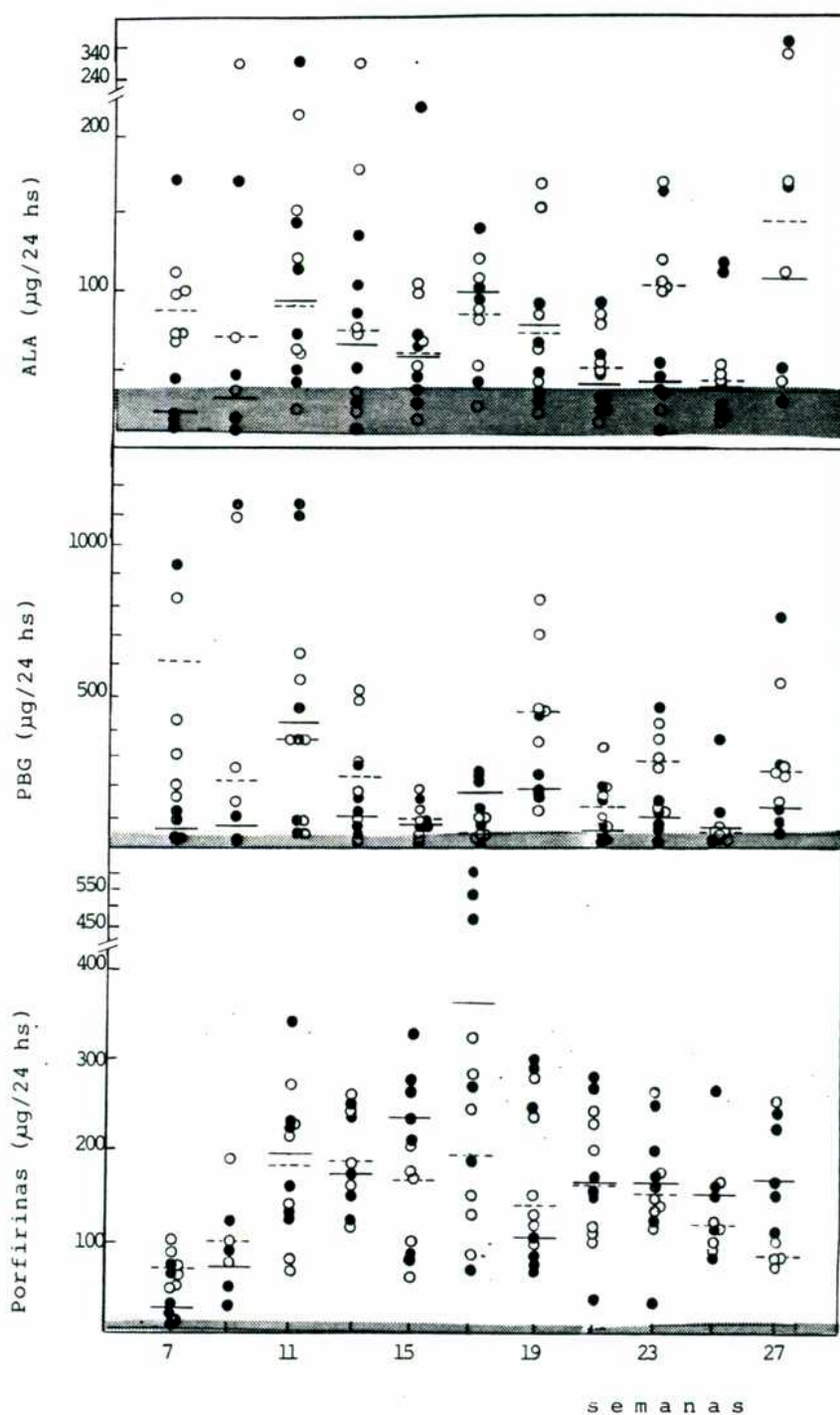
Las excreciones de ALA, PBG y porfirinas de los animales que recibieron DF no difirieron de las normales.

Después de la 7ma. semana los valores de la mediana para la excreción de ALA de los animales que reciben HCB empiezan a alejarse de los valores normales. A lo largo del tratamiento, los animales individuales presentan más de un pico de excreción que corresponden de 7 a 15 veces los valores normales ($25 \mu\text{g ALA}/24 \text{ hs.}$). Después de un pico de excreción, el contenido de ALA desciende bruscamente. Por esta razón varias medianas se encuentran dentro del rango de valores normales entre las semanas 16 y 27 de tratamiento.

Respecto del contenido urinario de PBG puede verse Fig. 31 que igual que ALA presenta un comportamiento oscilatorio los valores de las medianas, empiezan a apartarse del valor normal $9,0 \mu\text{g PBG}/24 \text{ hs.}$ a partir de 5ta. semana. Presenta picos de excreción (200 veces el valor normal) en los animales individuales y también algunas ratas presentan valores normales.

En cuanto a la excreción de porfirinas de los animales tratados con HCB puede observarse que va incrementándose en forma progresiva hasta la semana 11era., luego llega

Fig. 31. Excreción de ALA, PBG y porfirinas. Efecto de DF una vez establecida la porfiria.



Ratas hembras fueron tratadas diariamente con HCB por 27 semanas. En la semana 17 la mitad de los animales recibió, además del fungicida DF. Cada punto representa la excreción urinaria de ratas individuales. (●) HCB, (○) HCB + DF. El sombreado representa la zona de valores normales que se superpone con la de los animales que reciben sólo DF, (—) valor de la mediana del grupo HCB+DF, (---) valor de la mediana del grupo HCB.

a una meseta hasta el final del tratamiento. Pese a las oscilaciones esta meseta representa 100 veces el valor de las normales (2 μg porfirinas/24 hs.). Algunos animales llegan a presentar valores de 590 μg de porfirinas/ 24 hs.

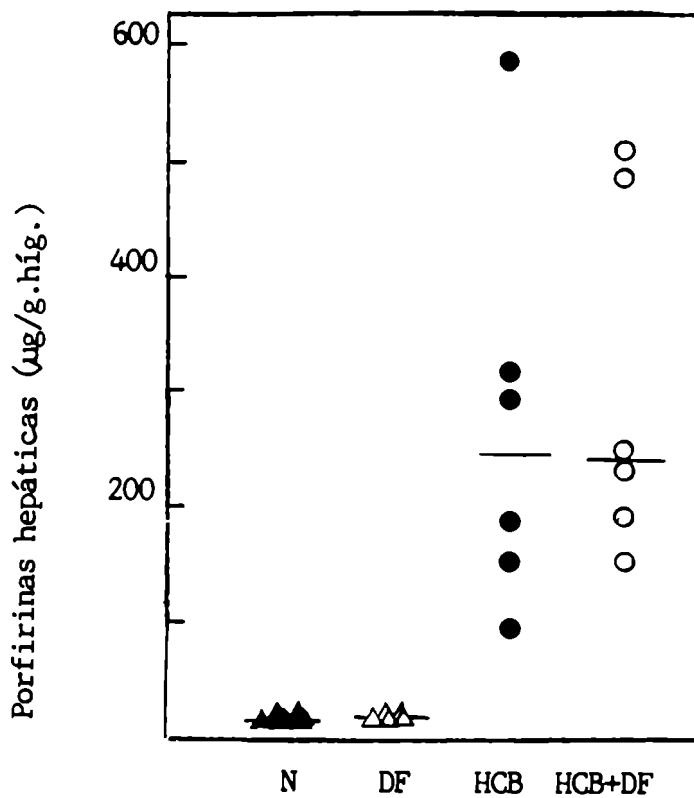
Los animales drogados con HCB durante 17 semanas que luego reciben DF presentan un comportamiento similar a los que sólo reciben HCB en cuanto a las excreciones de precursores y porfirinas. Así tanto para ALA como para PBG las medianas de ambos lotes (HCB y HCB + DF) presentan valores muy semejantes y en el caso de porfirinas si bien la mayoría de las medianas del lote HCB + DF estuvo debajo de los valores del lote HCB, la diferencia no es significativa. Cuando se comienza a administrar el quelante (semana 17) se vió una diferencia considerable entre las medianas de ambos lotes, no obstante esto podría atribuirse a que tres de los animales que sólo recibieron el fungicida presentaron un máximo de excreción (450 a 590 μg de porfirinas/24 hs.); estos animales a la semana siguiente, sin modificación del tratamiento, excretan menores cantidades de porfirinas (190 a 290 μg de porfirinas/24 hs.).

DF en estas condiciones experimentales no fué capaz de disminuir las excreciones de precursores y porfirinas de ratas porfíricas por HCB.

b) Acumulación de porfirinas hepáticas.

En la Fig. 32 puede verse que nuevamente DF no afecta el contenido de porfirinas hepáticas. El HCB produce incrementos de 200 veces luego de 27 semanas de tratamiento. La

Fig. 32. Efecto de DF sobre la acumulación de porfirinas hepáticas.



.Los animales se sacrificaron en la semana 27. Cada punto representado corresponde a valores de ratas individuales (▲) N, (△) DF, (●) HCB, (○) HCB + DF. (—) representa el valor de las medianas.

administración de DF a las ratas porfíricas no modificó este parámetro cabe destacar que la mediana obtenida para el lote HCB es mayor respecto a la obtenida con 3 meses de intoxicación (Fig. 28, inciso 1.2.c).

c) Actividad enzimática de ALA-S.

DF no afectó la actividad de ALA-S (Fig. 33).

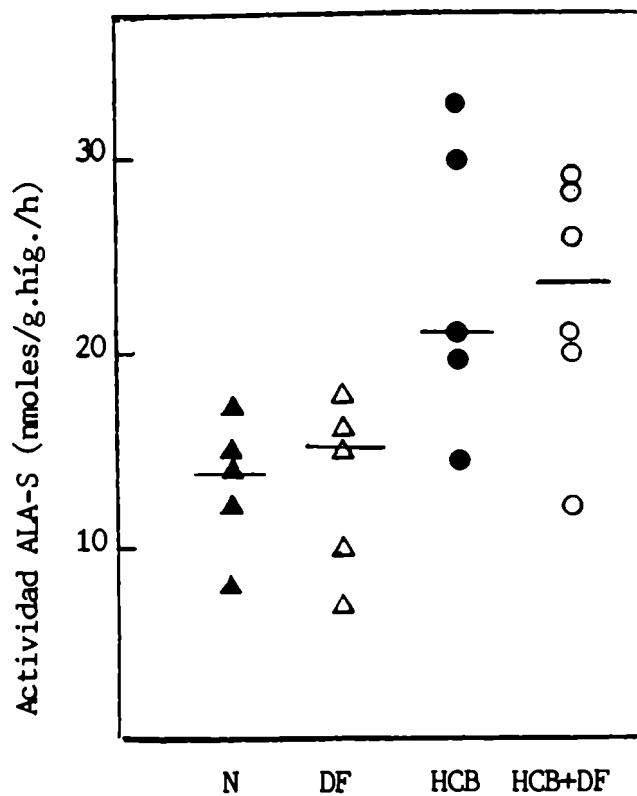
La actividad de ALA-S sufrió un ligero incremento para ambos lotes de animales HCB y HCB + DF no existiendo diferencias significativas entre ambos. Cabe mencionar que las medianas obtenidas en este experimento con 27 semanas de tratamiento por HCB sólo es ligeramente menor que con 14 semanas de tratamiento (Fig. 29, inciso 1.2.d).

d) Actividad enzimática de PCL.

La primer etapa de decarboxilación de PCL para los lotes HCB y HCB + DF disminuye un 80% y un 90% para la segunda etapa. No existiendo diferencias entre ambos lotes (Fig. 34).

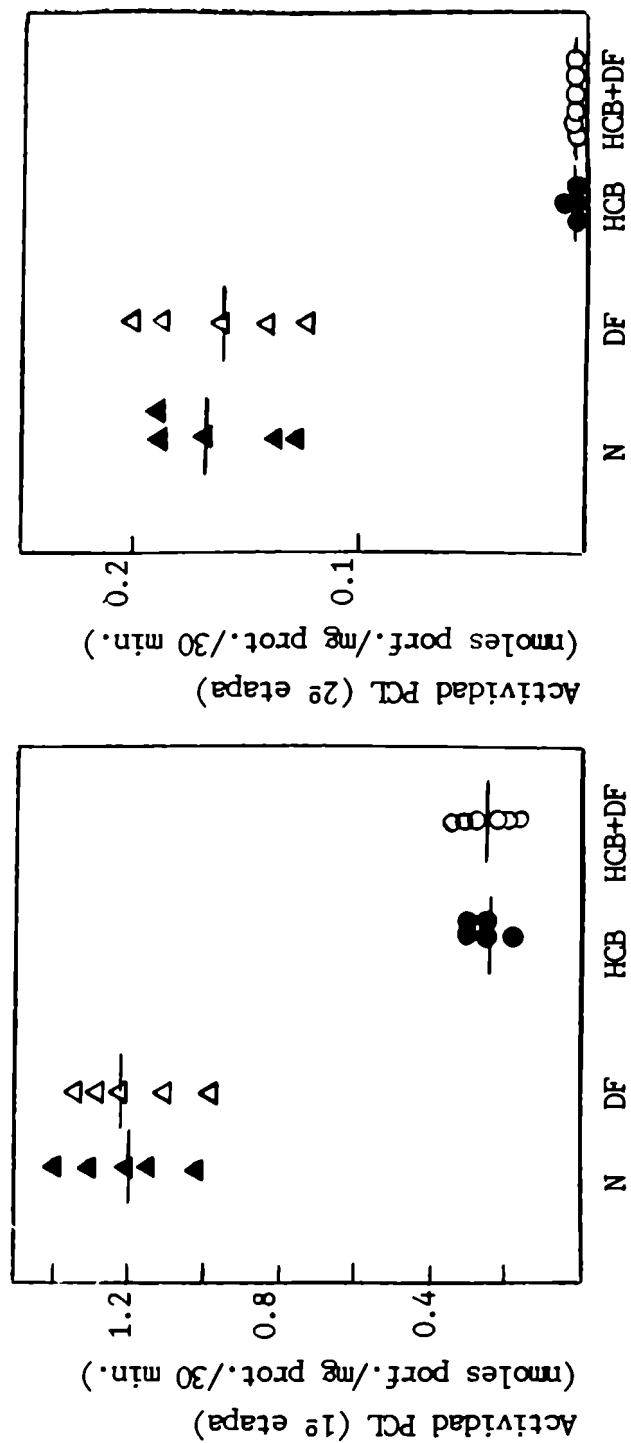
Respecto a la experiencia anterior (3 meses de drogado), en este caso (7 meses de drogado) la disminución de actividad de la primer etapa fué mayor para lote HCB 80% vs 55% de disminución.

Fig. 33. Efecto de DF sobre la inducción de ALA-S producida por HCB.



Los animales se sacrificaron en la semana 27. Cada punto representado corresponde a valores de ratas individuales. (▲) N; (△) DF; (●) HCB; (○) HCB + DF (—) representa la mediana de cada grupo de animales.

Fig. 34. Efecto del tratamiento con DF sobre el decremento de PCL producido por HCB.



Las ratas se sacrificaron en la semana 27. Cada punto representado corresponde a valores de ratas individuales. (▲) N, (△) DF, (●) HCB, (○) HCB + DF, (—) representa la mediana de cada grupo de animales.

DISCUSION.

La DF "in vivo" por sí sola no altera las excreciones de ALA, PBG y porfirinas en orina, ni el contenido de porfirinas, actividad de ALA-S y PCL en hígado de rata. Tampoco modifica "in vitro" las actividades de ALA-S y PCL de hígado de animales normales y porfíricos.

Cuando DF se da conjuntamente con el HCB, se retrasa y disminuye marcadamente la excreción urinaria de precursores y porfirinas, así como la concentración de porfirinas hepáticas, elevadas por el fungicida, esto es consecuencia de que el quelante de hierro aproxima a valores normales las actividades de ALA-S y PCL aumentadas y disminuídas respectivamente por el HCB.

DF no puede revertir ni mejorar en las condiciones ensayadas una porfiria experimental por HCB cuando el quelante se comienza a administrar una vez que se alcanza un estado de porfiria severa.

Sinclair y Granick (198) en cultivo de células de embrión de pollo encuentran que DF aumenta la inducción de ALA-S por AIA. Contrariamente Liem y col. (273) informaron que la DF no tiene efecto sinérgico sobre la inducción de ALA-S por AIA y que este quelante decrece la inducción de esta enzima promovida por DDC en hígado de rata. En este sentido los resultados de este trabajo muestran que DF no altera los parámetros estudiados del metabolismo del hemo, ni tiene efecto sinérgico sobre la inducción de ALA-S por HCB; esto indicaría que el bloqueo de ferroquelatasa

producido por DF (273, 198) no afectaría el "pool" de hemo regulatorio como para inducir la enzima ALA-S. Un papel adicional y directo del hierro en la inducción de ALA-S (274, 275, 276, 277) podría no ser descartado y estaría avalado por los trabajos que muestran "in vivo" que una sobrecarga de hierro produce un aumento de ALA-S (275, 276, 277) mientras que una deficiencia del mismo en la dieta (277) o la administración de DF (274) no modifica la actividad esta enzima. Por otro lado en este trabajo, el metal parece no contribuir al aumento de la actividad de esta enzima en hígados porfíricos dado que DF no disminuye "in vitro" su actividad.

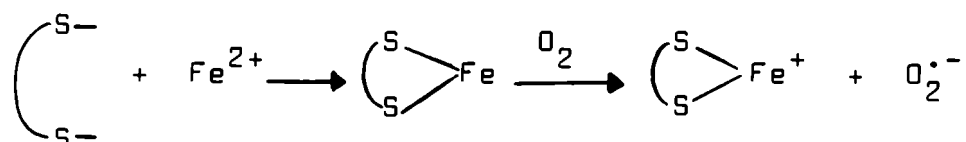
El hecho que la administración conjunta de HCB y DF atenúa y retarda los efectos del fungicida está de acuerdo con los resultados de Blekkenhorst y col. (278) que informaron que la reducción de niveles de hierro por flebotomía durante la administración del HCB disminuye los efectos porfirinogénicos del fungicida en ratas y por los de Sweeney y col. (215) quienes observaron que la flebotomía y una dieta deficiente en hierro previene la disminución de PCL producida por 2,3,7,8- tetraclorodibenzo-p-dioxina. En el mismo sentido Sinclair y Granick (198) encontraron que en presencia DF, lindano y bifenilos policlorados producen acumulación de Proto en lugar de Uro en cultivo de células hepáticas de embrión de pollo. Recientemente Sinclair y col. (272) informaron que DF revierte el decremento de PCL promovido por bifenilos policlorados, por inhibición de la síntesis del citocromo P-448. De Matteis y col. (279) encuentran también

que DF disminuye la acumulación de Uro y Firia en cultivo de hepatocitos de embrión de pollo tratados con ALA Y más marcadamente cuando se administra tetraclorobifenilos.

Por otro lado cabe mencionar las reacciones en que participa el hierro que pueden tener relación con el establecimiento de la PCT:

1) El hierro estimula peroxidación lipídica, con el consiguiente daño de membranas y formación de radicales libres (280, 281).

2) El Fe^{2+} es de por sí tóxico, se une a SH de enzimas inactivandolas y cataliza procesos oxidativos (102, 223) generando radicales libres en presencia de O_2 y un donador de electrones por ejemplo cisteína (102):



el $O_2^{\cdot -}$ por la reacción de Haber Weiss genera radicales $\cdot OH$



3) El Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} por el sistema de transporte de electrones que está fuertemente acoplado al sistema de oxidación de drogas dependiente del citocromo P-450. Cualquier situación de desacople por ejemplo drogas de lenta metabolización, estimulan la cadena de transporte de electrones, con el consiguiente incremento de Fe^{2+} (223).

4) Las porfirinas en las reacciones de peroxidasa: ($H_2O_2/NADPH$) inhiben la formación de $O_2^{\cdot -}$ y aumentan la formación $\cdot OH$ luego

del agregado de Fe-EDTA donde se formaría una porfirina anión radical. Este radical podría reemplazar al $O_2^{\cdot-}$ en la reacción de Haber Weiss para generar $\cdot OH$ (282).

5) El sistema hipoxantina/xantina oxidasa/ Fe-EDTA, oxida Uro' gen a Uro y a compuestos más polares no porfirínicos que tendrían acción inhibitoria en la PCL (283).

6) Elder y col. (284) presumen que se formaría un quelato Fe-porfirina cerca del sitio activo de PCL catalizando la formación local de radicales hidroxilos de corta vida.

En pacientes con PCT, la flebotomía o la terapia con quelante mejora los parámetros bioquímicos y produce remisión (285, 286, 287). Recientemente Elder y col. (156) reportaron por primera vez que cuatro pacientes con PCT esporádica, con remisión prolongada luego de flebotomía poseían actividad de PCL hepática e inmunoreactividad normal; la clave de este evento estaría en el tiempo prolongado que media entre la flebotomía y las mediciones. Ellos especulan que una reacción dependiente de hierro estaría involucrada, permitiendo la remoción del hierro, se retarda o frena el proceso de inactivación de PCL, permitiendo que la enzima inactiva sea reemplazada por una recientemente sintetizada.

Los resultados de este trabajo podrían implicar que DF como quelante de hierro y secuestrador de radicales libres (288) por un lado disminuye la cantidad de hierro circulante impidiendo el inicio de las secuencias de reacciones que junto al fungicida pueden llevar al establecimiento de

porfiria , y por otro lado como secuestrador de radicales libres eliminaría lo que se haya formado. Respecto al hecho que diez semanas de tratamiento con DF no pudieron mejorar una porfiria severa y bien establecida, cabe pensar que una vez puesto en marcha el mecanismo de acción del fungicida con indudable participación del hierro, no pueda ser frenado sólo por la disminución del metal, dado que en las presentes condiciones experimentales, se siguió administrando el fungicida hasta el final del experimento y no se realizaron mediciones más allá de éste período.

C A P I T U L O I V .

"ESTUDIOS TENDIENTES A ELUCIDAR EL MECANISMO DE ACCION DEL HCB".

D. "ESTUDIO DEL SITIO ACTIVO DE LA PCL".

La PCL hepática es la única enzima del metabolismo del hemo cuya actividad está fuertemente disminuída en la porfiria experimental por HCB y en la porfiria cutánea tarda humana (171, 173, 213). Por lo tanto es la enzima clave para el estudio del daño metabólico, producido por la administración de este fungicida.

Respecto a la naturaleza del sitio activo de la PCL normal Molina y col. (108) han informado que compuestos de naturaleza fenólica son fuertes inhibidores "in vitro" de la enzima y postulan que ejercerían su acción por unión al mismo sitio donde lo hace el sustrato, sugiriendo un sitio positivo en la enzima (con respecto a este punto en el presente trabajo se ha demostrado que metabolitos del HCB de naturaleza fenólica resultaron fuertes inhibidores de la enzima (Capítulo II, inciso 2)). Kawanishi y col. (92) en la enzima de eritrocitos normales, encuentran que el dietil pirocarbonato la inhibe sugiriendo que histidina podría estar en o cerca del sitio activo de la enzima.

En PCL de *Rhodopseudomonas palustris* también se ha sugerido (99) que histidina podría estar involucrada en el mecanismo de acción de la enzima.

El objetivo de este trabajo es entonces, estudiar la naturaleza del sitio activo de la PCL purificada de hígado de rata y evaluar si el fuerte decremento de esta enzima,

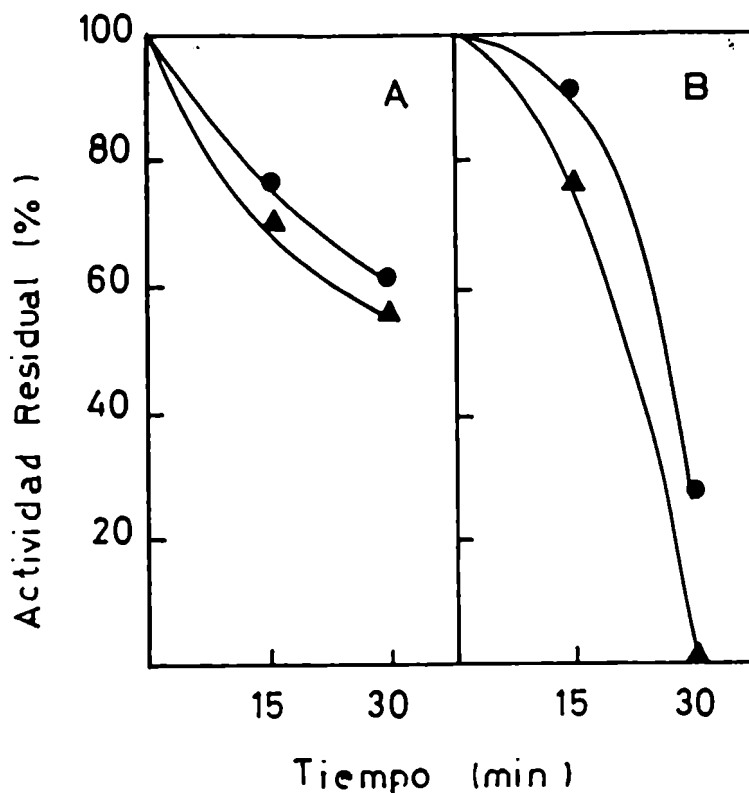
debido a la administración de HCB "in vivo", está relacionado a alteraciones en la estructura proteica en o cerca del sitio activo de la PCL.

Con este propósito se realizaron modificaciones químicas de la enzima purificada proveniente de animales normales e intoxicados por HCB. Se utilizaron reactivos que alteran aminoácidos de naturaleza básica. Se ha reportado (289, 290) que arginina sirve como sitio de reconocimiento positivo para sustratos negativamente cargados, siendo las dicetonas reactivos altamente específicos para su modificación. Por estos motivos se eligió trabajar con 2,3-butanediona y fenilgloxal (289, 290). Por otro lado se realizó fotooxidación con azul de metileno como sensibilizador, que modifica, histidina, triptofano, metionina, cisteína y tirosina, sin embargo los grupos SH son sensibles a este tipo de oxidación a pH mayores que 8 (291).

El dietilpicrocarbonato (DEPC) reacciona con residuos histidilos, rindiendo N- carbetoxihistidina. Esta reacción puede seguirse convenientemente observando el incremento de absorbancia que tiene un máximo entre 280 y 250 nm. La inactivación de la enzima puede correlacionarse con la modificación de histidina si hidroxilamina reactiva la enzima. Si bien otros aminoácidos pueden reaccionar con el DEPC la hidroxilamina remueve el grupo carbetoxi sólo de histidina y tirosina pero de este último a baja velocidad.

En la Fig. 35 se muestran los resultados de la fotooxidación con azul de metileno. Se puede ver que la actividad PCL de ambas fuentes enzimáticas están inhibidas en for-

Fig. 35. Foto-oxidación en presencia de azul de metileno de la PCL normal y porfírica.

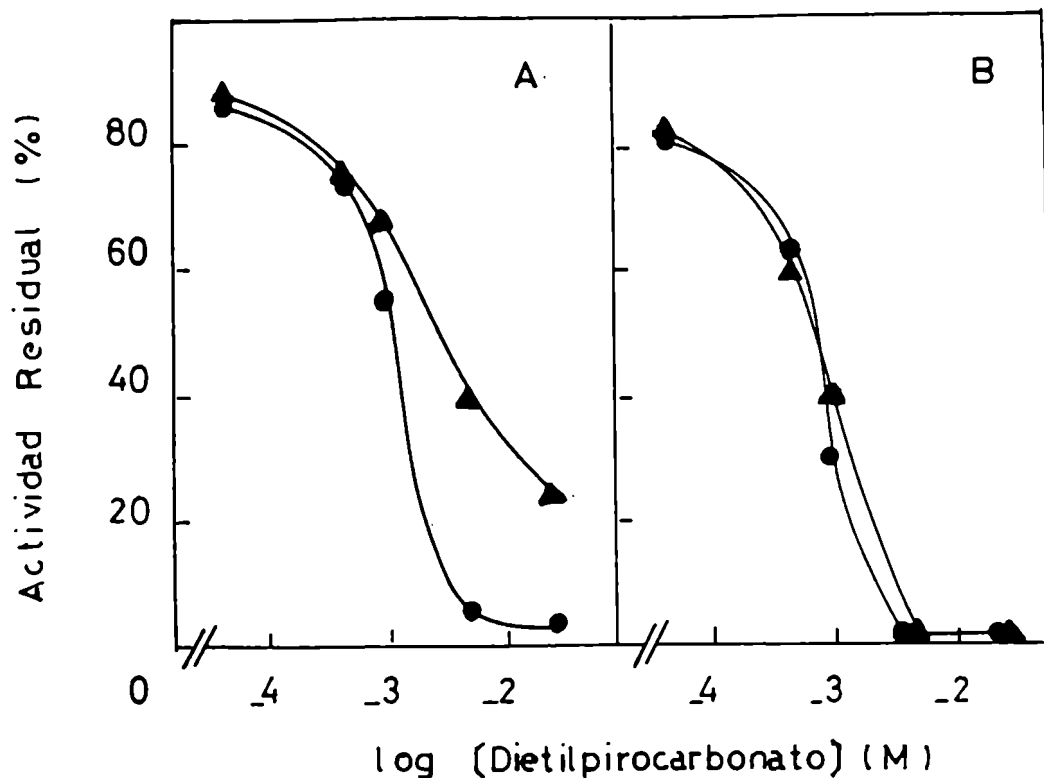


La foto-oxidación se realizó usando azul de metileno 0,003% como sensibilizador. El colorante se elimina por filtración por geles. A. primer etapa: decarboxilación del Uro'gen. B. segunda etapa: formación de Copro'gen. Las actividades residuales se calculan tomando como control (100%) los ensayos mantenidos en oscuridad. (●) PCL normal (▲) PCL porfírica.

ma similar. La primer decarboxilación del Uro'gen III está gradualmente alterada en función del tiempo de exposición a la luz, mientras que la actividad de la segunda etapa decrece abruptamente entre 15 y 30 min., quizás como consecuencia de dos efectos: la inactivación de las enzimas por la modificación química y la baja saturación de PCL debida a un decremento del flujo de sustrato (Penta'gen). Las actividades control fueron las mismas a 15 y 30 min. 2,05 y 0,98 nmol de Uro'gen decarboxilado en 30 min por mg de proteína para la primer etapa de las enzimas normales y porfíricas respectivamente y 0,35 y 0,045 nmol de Copro'gen formado en 30 min por mg de proteína para la segunda etapa de las enzimas normal y porfírica.

El efecto de diferentes concentraciones de DEPC en la PCL normal y porfírica puede verse en la Fig. 36. El decremento de la actividad de ambas enzimas fué remarcable a partir de 1 mM para la primer etapa de decarboxilación y 0,5 mM para la segunda. Al comparar el comportamiento de la enzima normal y porfírica, se encuentra que en la primer etapa para la enzima normal la actividad cae más abruptamente alcanzando valores más bajos que la porfírica. Este comportamiento diferencial a altas concentraciones del reactivo no pudo cuantificarse en la segunda etapa debido a la gran inhibición provocada por la droga. De hecho la actividad fué nula, no sólo para los animales porfíricos sino también para los normales. Sólo una pequeña diferencia entre ambas enzimas pudo observarse a 1 mM de reactivo.

Fig. 36. Efecto de DEPC en la actividad PCL normal y porfírica.



Los ensayos se realizaron como se describe en métodos. DEPC se analizó en concentraciones de 0,05; 0,5; 1,5 y 25 mM. El reactivo se eliminó por filtración por geles. A) primer etapa: decarboxilación del Uro'gen, B) segunda etapa: formación de Copro'gen. Las actividades residuales se calculan tomando como control (100%) el ensayo sin adición de DEPC. (●) PCL normal, (▲) PCL porfírica.

Ambas enzimas modificadas por DEPC recuperan su actividad cuando se tratan con hidroxilamina como puede verse en la Tabla XVII.

Cuando se realiza la reacción de modificación en la cubeta del espectrofotómetro pudo observarse para las enzimas normal y porfírica el incremento de absorbancia a 240 nm. Se utilizó para ello 0,2 mg de proteína aproximadamente, 2 mM de DEPC en un volumen final de 2,3 ml.

Para verificar si estas modificaciones implican aminoácidos involucrados en el sitio activo se protege el mismo con Uro'gen III antes de ser modificado con DEPC, ambas enzimas resultaron resguardadas de la acción del reactivo (Tabla XVIIID).

Es interesante señalar que en los ensayos de reversión y protección, la enzima porfírica alcanza un 100% de su actividad original en ambas etapas de decarboxilación.

El efecto de 2,3-butanediona fué ensayado a 5 y 50 mM durante 10 y 20 min. de preincubación. Las enzimas fueron más inhibidas a alta concentración de reactivo y a mayores tiempos. Siendo igual el comportamiento de las enzimas normal y porfírica. A bajas concentraciones de reactivo, las enzimas normal y porfírica presentan actividades relativas entre 90 y 80% para la primer etapa de decarboxilación y 80 - 65% para la segunda etapa de decarboxilación. A altas concentraciones del reactivo el grado de inhibición fué más notable estando las actividades remanentes para ambas enzimas en el rango 70- 45% para la primer decarboxilación y

TABLA XVIII. REVERSION POR HIDROXILAMINA Y PROTECCION POR UROPORFIRINOGENO III DE LA MODIFICACION

QUIMICA PRODUCIDA POR DEPC.

ENZIMA	T R A T A M I E N T O		A c t i v i d a d R e l a t i v a	
	Preincubación con Uroporfi- rinógeno III.	DEPC	Hidroxilamina	(%)
	13,5 μM	1 mM	0,8 M	Primer etapa Segunda etapa
Normal		+		55 ± 5 30 ± 5
		+		95 ± 9 83 ± 10
				90 ± 9 82 ± 10.
Porfírica		+		68 ± 5 40 ± 5
		+		100 ± 5 100 ± 10
		+		100 ± 5 100 ± 10

En los ensayos de reversión la enzima previamente modificada por dietilpirocarbonato, se deja reaccionar con hidroxilamina durante 1 h. a 25°C. En los ensayos de protección se preincuba la PCL con Uroporfirinógeno III 15 min. a 37°C antes de ser modificada. La modificación se realiza incubando con dietilpirocarboato 15 min. a 25°C, Las actividades relativas se calculan respecto a sus controles respectivos sin dietilpirocarbonato. Los resultados son el promedio de tres experimentos.

50 - 30% para la segunda etapa de decarboxilación (cabe aclarar que el rango de porcentajes presentados representa los resultados obtenidos a cortos y largos tiempos de modificación).

Para evaluar si arginina está involucrado en el sitio activo de PCL, se realizaron ensayos de protección con Uro'gen III de la inhibición provocada por 2,3-butanediona (Tabla XIX). Se preincubó la enzima 2 min. a 25°C con 11 μ M de Uro'gen III y la inhibición provocada por el reactivo no se altera, por lo tanto se probó concentraciones mayores de sustato para proteger, así como también mayores tiempos de preincubación y mayor temperatura, sin embargo la inactivación provocada por el reactivo, no fué prevenido en ningún caso.

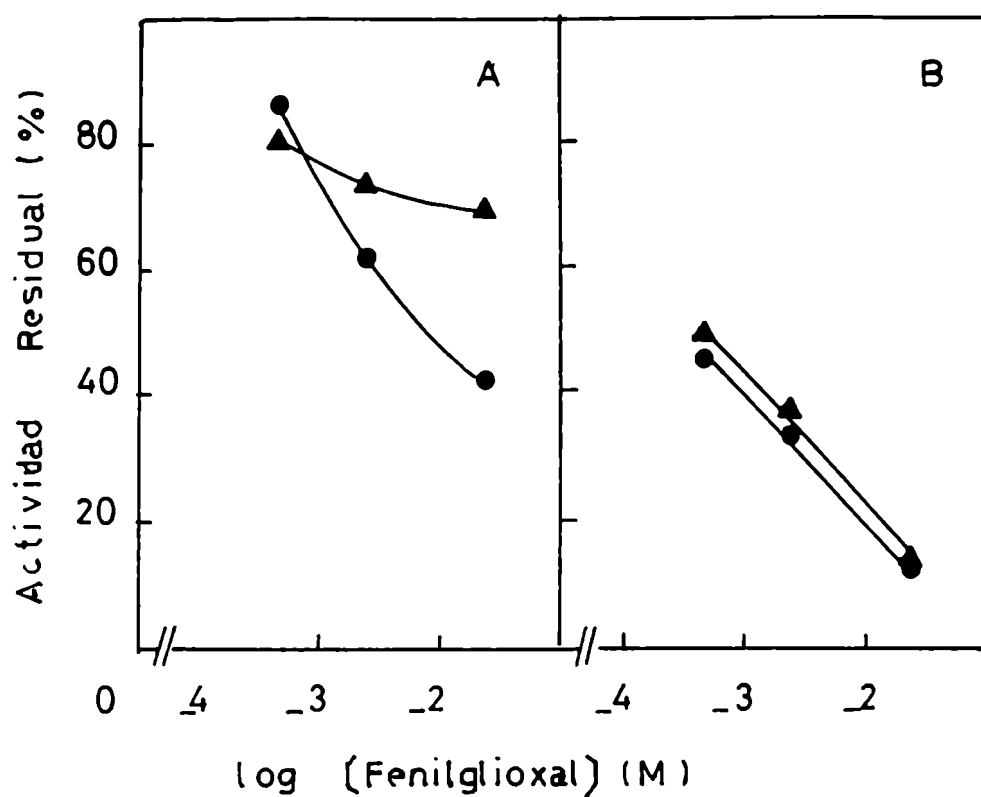
Fenilgloxal (Fig. 37) a todas las concentraciones ensayadas modifica la enzima de ambas fuentes, mostrando mayor efecto sobre la PCL normal a partir de 2,5 mM del reactivo. La segunda etapa para ambas enzimas fué también inhibida, pero las bajas actividades alcanzadas no permitió evaluar estrictamente las diferencias entre enzimas normal y porfírica.

TABLA XIX . PROTECCION DE PCL DE LA MODIFICACION CON 2,3-BUTANEDIONA.

ENZIMA	T r a t a m i e n t o				A c t i v i d a d r e l a t i v a	
	Pre-incubación con Uroporfirínógeno III		2,3 Butanediona		(%)	
	concentración (μ M)	tiempo temperatura (min) ($^{\circ}$ C)	50 mM		primer etapa	segunda etapa
Normal	-	-	+	54 \pm 5	47 \pm 5	
	11	2	+	55 \pm 6	50 \pm 5	
	17	5	+	53 \pm 7	41 \pm 4	
	17	15	+	55 \pm 5	46 \pm 5	
Porfírica	-	-	+	52 \pm 4	37 \pm 4	
	11	2	+	50 \pm 6	40 \pm 5	
	17	5	+	45 \pm 5	37 \pm 4	
	17	15	+	54 \pm 6	40 \pm 6	

La enzima fué preincubada con diferentes concentraciones de uroporfirínógeno, a diferentes tiempos y temperaturas previo a ser modificada con 2,3 butanediona 50 mM 10 min. a 25 $^{\circ}$ C. Las actividades relativas fueron calculadas respecto a su control respectivo sin 2,3-butanediona. Los resultados presentados son el promedio de cuatro experiencias.

Fig. 37. Efecto de fenilglioxal en la actividad PCL normal y porfírica.



Los ensayos se realizaron como se describe en métodos. Fenilglioxal fué ensayado en concentraciones de 0,5, 2,5 y 25 mM.

A) primer etapa: decarboxilación del Uro'gen.

B) segunda etapa: formación del Copro'gen.

Las actividades residuales se calculan tomando como control (100%) el ensayo sin adición del reactivo (●) PCL normal, (▲) PCL porfírica.

DISCUSION.

Todas las reacciones de modificación de PCL ensayadas inactivaron en diferente grado esta enzima sugiriendo entonces un entorno positivo del sitio activo de la misma.

Es interesante mencionar que el análisis de aminoácidos de PCL de eritrocitos humanos mostró que la enzima tiene un 10% de residuos aromáticos, 11 histidinas, 17 lisinas y 28 argininas por mol de enzima (93).

La modificación de arginina con dos reactivos mostró que la PCL es inactivada, pero el hecho que no sea protegida por Uro'gen III implica que este residuo no está directamente involucrado en la unión del sustrato, sin embargo estaría relacionado con la actividad de la enzima en algún punto crítico, quizás dando un entorno positivo necesario para favorecer la catálisis, o para mantener la integridad del sitio activo.

La inactivación de la enzima por fotooxidación da una amplia gama de posibles residuos afectados sin embargo al pH usado, los más probables serían histidina, triptofano y tirosina. En este sentido Battle y col. (293) encuentran fotoinactivación de PCL de eritrocitos humanos usando porfirinas como sensibilizadores, y adjudican este efecto a alteraciones en cisteína, histidina o triptofano. La inactivación con DEPC al pH 6,8 sería bastante específica para histidina lo que se corrobora por el aumento de absorbancia a 240 nm del n-carboxihistidina y su reversión por hidroxilamina, sin embargo queda la duda de la posible reacción de tirosina. La

PCL es protegida por el sustrato Uro'gen III, esto indica, que el residuo afectado está implicado en la unión del sustrato. Al comparar los puntos isoeléctricos de tirosina 5,65 e histidina 7,58 cabe pensar que al pH fisiológico histidina está cargada positivamente, haciendo suponer que en realidad sería mucho más probable que éste fuera el residuo involucrado en unir al sustrato .

La enzima PCL tendría entonces un entorno positivo de su sitio activo que favorecería la atracción del sustrato quien se uniría probablemente a través de una histidina.

Se ha postulado que la enzima tendría más de un sitio activo; Tomio y col. (89) postulan al menos dos sitios, de Verneuil y col. (93) postulan que tendría cuatro sitios y más recientemente Kurlandska y col. (294) trabajando con mutantes hem 12 de *Saccaromyces Cereviseae* que son deficientes total o parcialmente en PCL en un 50 a 100%, encuentran que las mutantes presentan "in vivo" un perfil de acumulación de porfirinas similar, pero "in vitro" existen diferencias en la actividad de las cuatro decarboxilaciones, y una mutante la hem 12-11 presenta un bloqueo en la tercer decarboxilación. Dado que las modificaciones químicas realizadas a la PCL de animales normales y porfíricos inactivaron ambas etapas de decarboxilación, siendo la segunda más afectada, se podría en principio suponer que los residuos estudiados estarían implicados con el sitio correspondiente a la decarboxilación del Uro'gen y quizás también con algún otro sitio involucrado en la segunda etapa de decarboxilación.

El análisis de la primer etapa de decarboxilación permite observar que las modificaciones con DEPC y fenilglioxal afectan más a la enzima normal que a la proveniente de animales porfíricos, incluso la actividad de la porfírica se recupera un 100% en las experiencias de reversión, así como también fué protegida en un 100% por el sustrato frente a la acción del DEPC. Estas evidencias avalarían que la enzima de animales que se intoxican con HCB tiene su sitio activo menos proclive a ser modificado.

El mecanismo de acción del HCB aún no ha sido elucidado totalmente, entre las hipótesis planteadas figuran: 1) unión covalente de algún metabolito reactivo del HCB a la enzima (182, 206), 2) que las drogas porfirinogénicas causan indirectamente el bloqueo del metabolismo del hemo estimulando la producción de especies reactivas, peróxidos, radicales libres (223, 224). sea desacoplando la cadena de transporte de electrones microsomal ó induciendo los sistemas enzimáticos en el hígado que favorecen la formación de hierro ferroso con su consiguiente efecto dañino, catalizando la formación de especies de oxígeno reactivos ó formando un inhibidor de PCL de alta afinidad (207). Las formas de oxígeno reactivas podrían inactivar la PCL. Por lo tanto cualquiera fuese la teoría válida, lo común sería afectar, la proteína enzimática para disminuir su actividad, dado que la cantidad de enzima inmunoreactiva no cambió (204). Es dable pensar entonces que la enzima proveniente de animales porfíricos es menos susceptible a ser modificada puesto que su

sitio activo está comprometido ya sea por unión de metabolitos del HCB o por reacción con especies de oxígeno activas o por unión de un inhibidor. Respecto a este punto se ha reportado que la PCL de eritrocitos humanos es susceptible de inactivarse por especies de oxígeno reactivas pero el mecanismo debe requerir un catalizador especial tal que afecte al sitio activo sin alterar los epitopes mayores de la proteína (295). Elder y col. (284) también presumen que un quelato de hierro porfirina catalizaría cerca del sitio activo la formación local de radicales hidroxilos de corta vida.

En este trabajo se ha encontrado que la PCL normal y porfírica tienen un entorno positivo en su sitio activo, estando probablemente el aminoácido histidina involucrado en el sitio de unión del Uro'gen. La enzima proveniente de animales porfíricos tendría su sitio activo comprometido, tal que es más refractaria a ser modificada por algunos reactivos que la enzima normal, así como también la acción de los mismos puede prevenirse y revertirse totalmente, mientras que la normal no logra la recuperación total.

C O N C L U S I O N E S .

Los resultados presentados pueden resumirse de la siguiente manera:

a) La cromatografía líquida de alta presión resultó un método muy útil, rápido y sensible para aplicar de rutina a la separación y cuantificación de porfirinas metil éster. Se pudo poner a punto más de un sistema de solventes para lograr una buena resolución, calibrándose para poder cuantificar las porfirinas con dos de dichos sistemas que son usados de rutina. Esta metodología fué aplicada a diversas situaciones, como ser, análisis de pacientes, contenidos hepáticos de porfirinas y determinación de la actividad PCL.

b) Se ensayó la capacidad de metabolitos del HCB para producir acumulación de porfirinas en embrión de pollo de 17 días, analizándose la naturaleza de las mismas. En dicho sistema se evaluó la capacidad de inducir la actividad de ALA-S, enzima regulatoria del camino. Se observó que los metabolitos de naturaleza fenólica fueron los que presentaron mayor poder para producir alteraciones en el metabolismo de porfirinas, también se señaló que el HCB sólo no produce alteraciones y que tiene un efecto sinérgico con el FB. El FB "per se" altera el contenido de porfirinas y el perfil de acumulación de las mismas, a pesar de no ser un hidrocarburo aromático halogenado. La mayoría de los metabolitos del HCB no produjo acumulación mayoritaria de Uro respecto de las porfirinas menos carboxiladas, que implicaría una inhibición de PCL, salvo el caso del PCF

en el que quizás puede adjudicarse a dicho efecto.

"In vitro" los metabolitos de naturaleza fenólica fueron fuertes inhibidores de la actividad PCL de rata, destacándose la acción de la TCH, acción que podría deberse a la formación de radicales libres.

Se extrajo y caracterizó al inhibidor de la actividad PCL de hígado de rata. El poder inhibitorio o la cantidad del mismo formado en hígado de ratas intoxicadas con HCB fué mayor cuanto más porfírico estaba el animal del cual se extrajo. No pudo extraerse por los métodos habituales para extraer metabolitos del HCB y presentó polaridad mayor que las porfirinas acumuladas en hígado de ratas porfíricas (Uro y Firia). Es parcialmente termoestable y está asociado a proteínas hepáticas.

c) Respecto al efecto del hierro, se vió que tiene incidencia en el establecimiento de porfiria dado que la disminución del contenido de hierro por DF retarda y atenúa el establecimiento de porfiria, pero una vez establecida la misma no se puede revertir.

d) Los estudios del sitio activo de PCL de hígado de rata mostraron que la misma tiene un entorno positivo en su centro activo, que histidina está involucrada en el sitio catalítico de la PCL y que arginina si bien está involucrada con la actividad de la enzima no se relaciona directamente con la unión del Uro'gen. La PCL proveniente de animales porfíricos resultó más resistente a la acción

de las modificaciones con DEPC y fenilgloxal poniendo de manifiesto que el centro activo de la enzima está alterado.

Estos hallagos permiten concluir que si bien los metabolitos del HCB pueden alterar el metabolismo de las porfirinas y la actividad PCL "in vitro", no serían los responsables directos del establecimiento de porfiria. El mecanismo de acción del HCB implicaría la formación de un inhibidor, distinto de un metabolito del HCB, de naturaleza más polar que Uro, cuya potencia o cantidad se incrementa con el grado de porfiria del animal. Este inhibidor sería el responsable de bloquear en parte al centro activo de la PCL, explicando así, la menor acción de algunos modificadores del sitio activo.

Respecto a la formación del inhibidor hay dos teorías planteadas, una avalada por el grupo de Francis y Smith (283, 296) que supone que los xenobióticos desacoplan la cadena de transporte de electrones del sistema metabolizante de drogas, dependiente del citocromo P-450, coincidiendo con De Matteis y Sionard (223), produciendo un proceso oxidativo crónico aumentado por el hierro con participación de $\cdot\text{OH}$. Este proceso daría lugar a la formación del inhibidor que sería una porfirina hidroxilada ó N-oxidada (296) o un compuesto no porfirínico más polar que las porfirinas semejante al que se forma "in vitro" cuando el Uro'gen está en presencia de un sistema generador de radicales hidroxilos como hipoxantina/xantina oxidasa/

Fe-EDTA (283). La otra teoría sustentada por Elder y col. (284) sugiere que el inhibidor de PCL se dirige específicamente al sitio activo de PCL sin afectar los epitopes principales de la enzima. Se postula la formación de un quelato Fe-porfirina durante la oxidación de los porfirinógenos a porfirinas que se uniría cerca del centro activo de la PCL, este quelato inactivaría la enzima por formación de un inhibidor de corta vida.

Los resultados aquí presentados avalan la formación, con posible intervención del hierro, de un inhibidor más polar que las porfirinas, el cual se uniría a la PCL en las proximidades del sitio activo, alterando la funcionalidad del mismo.

L. Sauerbrey

W. Hill

B I B L I O G R A F I A .

BIBLIOGRAFIA.

- 1) De Matteis, F. (1967). Pharmacological Reviews 19 (4), 523.
- 2) Gibson, K.D., Laver, W.G. y Neuberger, (1958). Biochem. J. 70, 71.
- 3) Kikuchi, G., Kumar, A., Talmage, P. y Shimin, D. (1958). J. Biol. Chem. 233, 1214.
- 4) Scholnick, P.L., Hammaker, L.E. y Marver, H.S. (1972). J. Biol. Chem. 247 (13), 4132.
- 5) Abboud, M.M., Jordan, P.M., Akhtar, M. (1974). J. Chem. Soc. Chem. Commun. 643.
- 6) Akhtar, A., Abboud, M.M., Barnard, G., Jordan P.M. y Zaman, Z. (1976), Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 273, 117.
- 7) Mac Kay, R., Druyan, R., Cetz, G.S. y Rabinowitz, M. (1969). Biochem. J. 114, 455.
- 8) Burmham, B.F. y Lascelles, J. (1963). Biochem. J. 87, 462.
- 9) Granick, S. (1966). J. Biol. Chem. 241 (6), 1359.
- 10) Sinclair, P.R. y Granick, S. (1975). Annals New York Acad. of Sciences 244, 589.
- 11) Sassa, S. y Granick, S. (1970). Proceedings of the National Acad. of Sciences 67 (2), 517.
- 12) Scholnick, P.L., Hammaker, L.E. y Marver, H.S. (1969). Proc. Natl Acad. Sciences USA. 63, 65.
- 13) Ades, I.Z. y Harpe, K.G. (1981). J. Biol. Chem 256, 9329.

- 14) Srivastava, G., Borthwith, I.A., Brooker, J.D., May, B.L. y Elliot, W.H. (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 110 (1), 23.
- 15) Watanabe, N., Hayashi, N. y Kikuchi, J. (1984), *Arch. of Biochem. and Biophys.* 232 (1), 118.
- 16) Hayashi, N., Joda, B., Kikuchi, G. (1970), *J. Biol. Chem.* 67 (5), 859.
- 17) Ades, I.Z. y Stevens, T.M. (1988). *Int. J. Biochem.* 20 (9), 959.
- 18) Nakakuki, M., Yamabuchi, K., Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1980), *J. Biol. Chem.* 255 (4), 1738.
- 19) Srivastava, G., Borthwick, I.A., Brooker, J.D., May, B.K. y Elliot, W.H. (1988), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109 (2), 305.
- 20) Watanabe, N., Hayashi, N., Kikuchi, G. (1983), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113 (2), 377.
- 21) Pirola, B.A., Mayer, F., Borthwick, I.A., Srivastava, G., May, B.K. y Elliot, W.H. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 577.
- 22) Borthwick, I.A., Srivastava, G., Brooker, J.D., May, B.K. y Elliot, W.H. (1983). *Eur. J. Biochem.* 129, 615.
- 23) May, B.K., Borthwick, I.A., Srivastava, G., Pirola, B.A., Elliot W.H. (1986) *Current topics in cellular Regulation* volumen 28, pp. 233.
- 24) Borthwick, I.A., Srivastava, G., Day, A.R., Pirola, B.A., Snowwell, M.A. y May, B.K. (1985) *Eur. J. Biochem.* 150, 481.

- 25) Yamamoto, M., Jew, N.S., Federspul, M., Dogson, J.B., Hayashi, N. y Engel, J.D. (1985). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3702.
- 26) Eljerink, C.J., Srivastava, G., Maguire, D.J., Borthwick, I.A., May, B.K. y Elliot, W.H. (1987), J. Biol. Chem. 262 (9), 3988.
- 27) Granick, S. y Urata, G. (1963). J. Biol. Chem. 238, 821.
- 28) Lascelles, J. (1960). J. Gen. Microbiol. 23, 487.
- 29) Kurashima, Y., Hayashi, N. y Kikuchi, G. (1970). J. Biochem. (Tokyo), 67 (6) 863.
- 30) Wolfson, S.J., Bartczak y Bloomer, J.R. (1979), J. Biol. Chem. 254 (9) 3543.
- 31) Marks, G.S., Mc Cluskey, S.A., Mackie, J.E., Riddick, D.S., y James, C.A. (1988). FASEB J. 2, 2774.
- 32) Kikuchi, G. y Hayashi, N. (1981). Molecular and Cellular Biochemistry 37, 27.
- 33) Hamilton, J.W., Bement, W.J., Sinclair, P.R., Sinclair, J.F. y Wetterham, K.E. (1988). Biochem. J. 255, 267.
- 34) Grandchamp, B., Montgomery, D.B., Leckeo, V. y Schmid, R. (1981). J. Biol. Chem. 256 (22) 11677.
- 35) Badawy, A. A-B. (1979). Biochemical Reviews 7, 475.
- 36) Badawy, A. A-B, Morgan, C.J. (1980). Biochem. J. 186, 763.
- 37) Nandi, D.L. y Shemin, D. (1968). J. Biol. Chem. 243, 1236.
- 38) Jordan, P.M. y Sehra, J.S. (1980). J. Chem. Soc. Chem. Commun. 240.

- 39) Jordan, P.M. y Gibbs, P.N.B. (1955). *Biochem. J.* 227, 1015.
- 40) Kappas, A., Sassa, S., Anderson, K.E. (1982), "The metabolic basis of inherited diseases". (Ed. Stanburry, J.B., Wymgaardn, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L., Brown, M.S.), Cap. 60, "The Porphyrrias" pp. 1301-1384.
- 41) Busto, N., Stella, A.M., Wider de Xifra, E.A. y Batlle, A.M. (1980). *Int. J. Biochem.* 12, 745.
- 42) Wu, W.H., Shemin, D., Richards, K.E. y Williams, R.C. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 71, 1767.
- 43) Gibbs, P. N.B., Chaudhry, A.G. y Jordan, P.M. (1985). *Biochem. J.* 230, 25.
- 44) Barnard, G.F., Itoh, R., Hohberger, L.H. y Shemin, D. (1972). *J. Biol. Chem.* 252, 8965.
- 45) Tsukamoto, I., Yoshinago, T. y Sano, S. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67, 294.
- 46) Hasnain, S.S., Wardell, E.M., Garner, C.D., Schlosser, M. y Beyermann, D. (1985). *Biochem. J.* 230, 625.
- 47) Jaffe, E.K. y Hanes, D. (1986). *J. Biol. Chem.* 261, 9348.
- 48) Gibbs, P.N., Gore, M.G., Jordan, P.M. (1985). *Biochem. J.*, 225, 573.
- 49) Bishop, T.R., Frelin, L.P. y Boyer, S.H. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 5568.
- 50) Bishop, T.R., Frelin, L.P. y Boyer, S.H. (1986). *Nuclei. Acid. Res.* , 14 (24), 10115.

- 51) Battersby, A.B., Fookis, J.R., Matchin, G.W.J., Mc Donald, E. y Gustafson-Potter, K.E. (1979). J. Chem. Soc. Chem. Commun. 316.
- 52) Burton, G.P.E., Fogernass, S., Hcsozawa, S., Jordan, P.M. y Scott, A.I. (1979). J. Chem. Soc. Chem. Commun., 202.
- 53) Bogorad, L. (1958). J. Biol. Chem. 233, 501.
- 54) Frydman, R.B. y Frydman, B. (1973). Biochem. Biophys. Acta, 293, 506.
- 55) Russell, C.S., Poleack, S. y Jones, J. (1981). Ann. N.Y. Acad. of Sciences, 435, 202.
- 56) Jordan, P.M. Y Warrin, M.J. (1987). FEBS 225, 87.
- 57) Hart, G.J., Miller, A.D. y Battersby, A.R. (1988). Biochem. J. 252, 909.
- 58) Stevens, E., Frydman, R.B. y Frydman, B. (1968). Biochem. Biophys. Acta 158, 496.
- 59) Llambías, E.B.C. y Batlle, A.M. del C. (1971). Biochem. Biophys. Acta 227, 180.
- 60) Battersby, A.R., Mc Donald, E. (1978). Phil. Trans. R. Soc. Lond, B. 273, 161.
- 61) Rossetti, M.V., Juknat de Geralnick, A.A., Kotler, M., Fumagali, S. y Batlle, A.M. del C. (1980). Int. J. Biochem. 12, 761.
- 62) Jordan, P.M., Thomas, S.D., Warren, M.J. (1988). 254, 427.
- 63) Mazzetti, M.B., Tomio, J.M. (1988). Biochem. Biophys. Acta, 957, 97.

- 64) Sancovich, H.A., Ferramola, A.M., Batlle, A.M. del C., Kivilevich, A. y Grinstein, M. (1976). *Acta Physiol.* 26, 379.
- 65) Hart, J. y Battersby, A.R. (1985). *Biochem. J.* 232, 151.
- 66) Romeo, P.M., Raich, N., Dubart, A., Beaupain, A., Mattei, M.G. y Goosens, M. (1986). "Porphyrin and Porphyrins" (Ed. Y. Nordmann). Vol. 134, 25.
- 67) Grandchamp, B., de Verneuil, H., Beaumont, C., Chretien, S., Walter, O. y Nordmann, Y. (1987). *Eur. J. Biochem.* 162, 105.
- 68) Stubnicer, A.C., Picat, C. y Grandchamp, B. (1988). *Nucleic Acid. Res.* 16 (7), 3102.
- 69) Meister, M., Wanner, L., Eddy, R.E., Shows, T.B. (1980). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 170.
- 70) Bogorad, L. (1955). *Science* 121, 878.
- 71) Shemin, D., Russell, C.S. y Abramsky, T. (1955). *J. Biol. Chem.* 215, 613.
- 72) Mauzerall, D. y Granick, S. (1958). *J. Biol. Chem.* 232, 1141.
- 73) Hoare, D.S. y Heath, H. (1959). *Biochem. J.* 73, 679.
- 74) Conford, P. (1964). *Biochem. J.* 91, 64.
- 75) San Martín de Viale, L.C., Aragonés, A. y Tomio, J.M. (1976). *Acta Physiol. Latinoam.* 26, 403.
- 76) Smith, A.G. y Francis, J.E. (1979). *Biochem. J.* 183, 455.
- 77) De Verneuil, H., Grandchamp, B. y Nordmann, V. (1980). *Biochem. Biophys. Acta* 611, 174.

- 78) Cantoni, L., Dal Fiume, D. y Ruggieri (1984). Int. J. Biochem. 16 (5), 561.
- 79) Koopmann, G.E., Juknat de Geralnick, A.A. y Batlle, A. M. del C. (1986). Int. J. Biochem. 18 (10), 935.
- 80) Ríos de Molina, M. del C., Wainstok de Calmanovici, R. y San Martín de Viale, L.C. (1987). Int. J. Biochem. 19 (4), 365.
- 81) Romeo, G. y Levin, E.Y. (1971). Biochem. Biophys. Acta 230, 330.
- 82) Kushner, J.P., Steinmuller, D.P. y Lee, G.R. (1975). J. Clin. Invest. 56, 661.
- 83) Batlle, A.M. del C. y Grinstein, M. (1962). Biochem. Biophys. Acta, 62, 197.
- 84) San Martín de Viale, L.C. y Grinstein, M. (1968). Biochem. Biophys. Acta 158, 79.
- 85) Jackson, A.H., Sancovich, H.A., Ferramola, A.M., Evans, N., Games, D.E. y Matlin, S.A. (1976). Phil. Trans. R. Soc. Lond. 13, 273, 191.
- 86) Jackson, A.H., Rao, K.R.N., Supphayen, D.M. y Smith, S.G. (1977). J. Chem. Soc. Chem. Comm. 696.
- 87) Barnard, G.F. y Akhtar, M. (1978). J. Chem. Soc. Perkin I. 2354.
- 88) San Martín de Viale, L.C., Gracia, R.C., Pisarev, D.K. Tomio, J.M. y Grinstein, M. (1969). FEBS Letters 5 (2), 145.

- 89) Tomio, J.M., García, R.C., San Martín de Viale, L.C. y Grinstein, M. (1970). *Biochem. Biophys. Acta* 198, 353.
- 90) García, R.C., San Martín de Viale, L.C., Tomio, J.M. y Grinstein, M. (1973). *Biochem. Biophys. Acta* 309, 203.
- 91) Straka, G. y Kushner, P. (1983). *Biochemistry*, 22, 4664.
- 92) Kawanishi, S., Seki, S. y Sano, S. (1983). *J. Biol. Chem.* 258 (7), 4285.
- 93) De Verneuil, H., Sassa, S. y Kappas, A. (1983). *J. Biol. Chem.* 258 (4), 2454.
- 94) Smith, A.G. y Francis, J.E. (1981). *Biochem. J.* 195, 241.
- 95) Chen, T.C. y Miller, G.W. (1974). *Plant and Cell Physiol.* 15, 993.
- 96) Sassa, S., De Verneuil, H., Anderson, K.E. y Kappas, A. (1983). *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 96, 65.
- 97) Mukerji, S.K. y Pimstone, N.R. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127 (2), 517.
- 98) Taira, M. C. y San Martín de Viale, L.C. (1984). *Enzyme*, 31, 79.
- 99) Koopmann, G.E. y Batlle, A.M. del C. (1987). *Int. J. Biochem.* 19 (4), 373.
- 100) Woods, J.S., Kardish, R.M. and Fowler, B.A. (1981). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 103, 264.
- 101) Woods, J.S., Ealon, D.L. y Lukens, C.B. (1984). *Molecular Pharmacol.* 26, 336.

- 102) Murkerji, S.K., Pimstone, N.R., Burns, M. (1984).
Gastroenterology, 87, 1248.
- 103) Smith, A.G. y Francis, J.E. (1983). Biochem. J. 214, 909.
- 104) Blekk_enhorst, G.H., Eales, L. y Pimstone, N.R. (1979). S. Afr.
Med. J. 56, 918.
- 105) Hoare, D.S., Heath, H. (1958). Nature, 181, 1592.
- 106) Elder, G.H. y Tovey, J.A. (1977). Biochem. Soc. Trans.
5, 1470.
- 107) Elder, G.H., Tovey, J.A. y Sheppard, A.M. (1983). Biochem.
J. 215, 46.
- 108) Ríos de Molina, M. del C., Billi, S.C., Wainstok de
Calmanovici, R. y San Martín de Viale, L.C. (1984).
Acta physiol. pharmacol. latinoam. 34, 393.
- 109) Romeo, P.H., Rauch, N., Dubart, D., Beaupin, D., Pryor,
M., Kushner, J., Cohen-Solal, M. y Goossens, M. (1986).
J. Biol. Chem. 261 (21), 9825.
- 110) Mukeji, S.K. y Pimstone, N.R. (1987). Biochem. Biophys.
Res. Comm. 146 (3), 1196.
- 111) De Verneuil, H., Grandchamp, B., Fourbert, Ch., Weil, D.,
N'Guyen, V.C., Gross, M.S., Sassa, S., Nordmann, Y.
(1984). Am. J. Hum. Genet. 66, 202.
- 112) Eiberg, H., Mohr, J. y Staub, N.I. (1983). Clin. Genet.
23, 150.
- 113) Grandchamp, B., Weil, D., Nordmann, Y., N'Guyen, V.C.,
De Verneuil, H., Foubert, C., Gross, M.S. (1983). Hum.
Genet. 64, 180.

- 114) Romeo, P.H., Dubart, A., Grandchamp, B., De Verneuil, H., Rosa, J., Nordmann, Y. y Goossens, M. (1984). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 3346.
- 115) Grandchamp, B., Romeo, P.H., De Verneuil, H., Dubart, A., Goossens, M., Rosa, J. y Nordmann, Y. (1984). Biochem. Biophys. Res. Commun. 118(1), 378.
- 116) Grandchamp, B., Beaumont, C., De Verneuil, H., Walter, O. y Nordmann, Y. (1986). Porphyrins and Porphyrias, Y. Nordmann ed., Vol. 134, pp. 35-44.
- 117) Romana, M., Dubart, A., Beaupan, A., Chabret, C., Goossens, M. y Romeo, P.H. (1987). Nuclei , Acids. Res. 15 (18), 7343.
- 118) Romano, M., Le Boulch, P. y Rondo, P.H. (1987). Nuclei. Acids. Res. 15 (17), 7211.
- 119) Yoshinaga, T. y Sano, S. (1980). J. Biol. Chem. 255, 4727.
- 120) Batterby, A.R., Baldas, J., Collins, J., Grayson, D.H., James, K.J., Mc Donald, E. (1972). J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1265.
- 121) Sano , S. (1966). J. Biol. Chem. 245, 5276.
- 122) Jackson, A.H., Jones, D.M., Philip, G., Lash, T.D., Batlle, A. M. del C., Smith, S.G. (1980). Int. J. Biochem. 12, 681.
- 123) Zaman, Z. AKHTAR, M. (1976). Eur. J. Biochem. 61, 215.
- 124) Elder, G.H. y Evans, J.O. (1978). Biochem. J. 172, 345.

- 125) Grandchamp, B. Phung, N. y Nordmann, Y. (1978). Biochem. J. 176, 97.
- 126) Camadro, J.M., Chambon, H., Jolles, J. y Labbe, P. (1986). Eur. J. Biochem. 156, 579.
- 127) Batlle, A.M. del C., Benson, D. y Rimington, C. (1965). Biochem. J. 97, 731.
- 128) Deybach, J.C., Da Silva, V., Grandchamp, B. y Nordmann, Y. (1985). Eur. J. Biochem. 149, 431.
- 129) Labbe, R.F. y Hubbard, N. (1960). Biochim. Biophys. Acta, 41 185.
- 130) Porra, R.J., Jones, O.T.G. (1963). Biochem. J. 87, 186.
- 131) Jones, O.T.G. (1968). Biochem. J. 107, 113.
- 132) Dailey, H.A. (1982). J. Biol. Chem. 257, 14714.
- 133) Jones, O.T.G. y Jones, M.S. (1969). Biochem. J. 113, 507.
- 134) Harbin, B.M. y Dailey, H.A. (1985). Biochemistry, 24, 366.
- 135) Jones, M.S. Y Jones, O.T.G. (1970). Biochem. J. 119, 453.
- 136) Dailey, H.A. y Fleming, J.E. (1983). J. Biol. Chem. 258 (19) 11453.
- 137) Dailey, H.A. (1984). J. Biol. Chem. 259(4), 2711.
- 138) Dailey, H.A. (1985). Biochemistry 24, 1287.
- 139) Taketani, S. y Tokunaga, R. (1981). J. Biol. Chem. 256, 125.
- 140) Taketani, S., Tokunaga, R. (1982). Eur. J. Biochem. 127, 443.

- 141) Cánepa, E.T. y Llambías, E.B.C. (1988). *Biochem. and Cell. Biol.* 66, 32.
- 142) Abraham, N.G., Lin, J.H.C., Schwartzman, Levere, R.A., y Shibara, S. (1988). *Int. J. Biochem.* 20 (6) pp. 543, "Review".
- 143) Maines, M.A. (1988). *FASEB. J.* 2, 2557. "Review".
- 144) Tomaro, M.L., Frydman, R.B., Frydman, B., Pandey, R.K. y Smith, K.M. (1984). *Biochem. Biophys. Acta*, 791, 342.
- 145) Maines, M.B., Abraham, N.G. y Kappas, A. (1977). *J. Biol. Chem.* 252, 5900.
- 146) Yoshida, T. y Kikuchi, G. (1978). *J. Biol. Chem.* 253, 4224.
- 147) Yoshinaga, T., Sassa, S. y Kappas, A. (1982). *J. Biol. Chem.* 257 7778.
- 148) Yoshida, T., Birq, P., Cohen, T., Müller, R.M., Shibara, S. (1988). *Eur. J. Biochem.* 171, 457.
- 149) Maines, M.D. y Kappas, A. (1977). *Science*, 198, 1215.
- 150) Müller, R.M., Taguchi, H. y Shibara, S. (1987). *J. Biol. Chem.* 262, 6795.
- 151) Shibahara, S., Müller, R.M., Taguchi, H. (1987). *J. Biol. Chem.* 262, 12889.
- 152) Batlle, A. M. del C. y Magnun, P. (1986). Porfirias y Porfirinas, *Acta Bioquímica Clínica Latinoam. suplemento 2*.
- 153) Smith, A.G. y De Matteis, F. (1980). *Clin. in Haematol.* 9, 399.

- 154) Rimington, C. (1985). Scand. J. Lab. Clin. Invest. 45, 291.
- 155) Lázaro, P., De Salamanca, R.E., Elder, G.H., Villaseca, M.L., Chinarro, S. y Jaqueti, G. (1984). British Journal of Dermatol. 110, 613.
- 156) Elder, G.H., Urquhart, A.J., De Salamanca, R.E., Muñoz, J.J. y Bonkovsky, H.L. (1985). The Lancet 3 de agosto, 229.
- 157) Sassa, S., Anderson, K.E. y Kappas, A. (1986). "Porphyrins and porphyrias", (Nordmann, Y. ed.), 134, 45-53.
- 158) De Verneuil, H., Beaumont, C., Deybach, J.CH., Nordmann, Y., Star, Z. y Kastally, R. (1984). Am. J. Hum. Genet. 36, 613.
- 159) De Verneuil, H., Grandchamp, C., Beaumont, C., Picat, Ch., Nordmann, Y. (1986). Science, 234, 732.
- 160) De Verneuil, H., Beaumont, C., Grandchamp, B., Phung, L.N. y Nordmann, Y. (1986). "Porphyrins and porphyrias" (Nordmann, ed.) 134, 201-208.
- 161) Catingil, A.I., y Ozen, N.A. (1960). Blood. 16, 1002.
- 162) Cam, C. y Nigogosyan, G. (1963). J. Am. Med. Assoc. 183, 90.
- 163) Ockner, R.K. y Schmid, R. (1961). Nature, 189, 499.
- 164) De Matteis, F., Prior, B.E. y Rimington (1961), Nature, 191, 363.

- 165) Vos, J.G., Van Der Maas, M.L., Musch, A. y Ram, E. (1971). *Toxicol. and Appl. Pharmac.* 18, 944.
- 166) Smith, A.G., Francis, J.E., Kay, S.J.E., Greig, J.B. y Stewart, F.P. (1986). *Biochem. J.* 238, 871.
- 167) Carpenter, H.M., Williams, D.E., Henderson, M.C., Bender, R.C. y Buhler, D.R. (1984). *Biochem. Pharmacol.* 33, 3875.
- 168) San Martín de Viale, L.C., Viale, A.A., Nacht, S. y Grinstein, M. (1970). *Clin. Chim. Acta.* 28, 13.
- 169) Gajdos, A. y Gajdos, T.M., (1961). *Rev. Franc. Etudes Clin. Biol.* 6, 549.
- 170) Ríos de Molina, M.C., Wainstok de Calmanovici, R., Tomio, J.M. y San Martín de Viale, L.C. (1975). *Anales Asoc. Quim. Arg.* 63, 313.
- 171) San Martín de Viale, L.C., Ríos de Molina, M. del C., Waisntok de Calmanovici, R. y Tomio, J.M. (1975). *Biochem. J.* 168, 393.
- 172) Elder, G.H., Evans, J.O. y Matlin, S. (1976). *First Int. Porphyrin. Meet. Porphyrins in Human Diseases* (Doss, M. ed.) 424-431. Karger, Basel.
- 173) Waisntok de Calmanovici, R., Ríos de Molina, M. C., Taira de Yamasato, C., Tomio, J.M. y San Martín de Viale, L.C. (1984). *Biochem. J.* 218, 753.
- 174) Smith, A.G., Cabral, J.R.P., De Matteis, E. (1979). *Chem. Biol. Interact.* 27, 353.

- 175) Debets, F., Reinders, J.H., Koss, G., Seidel, J. y Strik, A. (1981). *Chem. Biol. Interact.* 37, 77.
- 176) Wainstok de Calmanovici, R., Billi de Catabbi, S.C., Aldonatti, C. y San Martín de Viale, L.C. (1989). *Int. J. Biochem.* 21 (4), 377.
- 177) Smith, A.G. y Francis, J.E. (1981). *Biochem. Pharmacol.* 30, 1849.
- 178) San Martín de Viale, L.C., Russo, M.C. y Grinstein, M. (1968). *Actas del primer congreso latinoam. de bioquim. clin.*, 168.
- 179) San Martín de Viale, L.C., Tomio, J.M., Ferramola, A.M., Sancovich, H.A. y Tigier, H.A. (1976). *Porphyris in Human Diseases, 1st. Int. Porphyrin. Meet. Freiburg/Br.* 1975, pp. 453-458.
- 180) Rizzardini, M. y Smith, A.G. (1982). *Biochem. Pharmac.* 31 (22), 3543.
- 181) Stewart, F.P. y Smith, A.G. (1987). *Biochem. Pharmac.* 36, 2232.
- 182) Debets, F.M.N.H. (1981). "Contribution to the elucidation of the mechanism of hepatic porphyria induced by hexachlorobenzene and related polyhalogenated hydrocarbons". Ph D. Thesis, University of Wageningen.
- 183) Stonard, M.D. (1975). *Biochem. Pharmacol.* 24, 1959.
- 184) Goldstein, J.M., Linko, P., Hahn, M.E., Gasiewicz, T.A. y Jeowell, H.N. (1986). *IARC Scientific Publication N° 77* (Morris, C.R. y Cabral, J.R.P. ed.) 519.

- 185) Jones, K.G. y Sweeney, G.D. (1977)..Res. Comn. Chem. Pathol. Pharmacol. 17, 631.
- 186) Linko, L., Jeowell, H.N., Gasiewicz, T.A. y Goldstein, J.A. (1986). J. Biochem. Toxicol. 1 (2), 95.
- 187) Mehendale, H.M., Fields, M. y Matthews, H.B. (1975). Agricultural and Food Chemistry 23 (2), 261.
- 189) Koss, G., Korasky, W. y Steinbach, K. (1976). Arch. Toxicol. 35, 107-114.
- 190) Lui, H. y Sweeney, D. (1975). FEBS Letters, 51, 225.
- 191) Koss, G., Seubert, S., Seubert, A., Koransky, W. y Ippen, H. (1978). Arch. Toxicol. 40, 285.
- 192) Koss, G., Reuter, A. y Koransky, W. (1986). IARC Scientific Publications N^o 77 (Morris, C.R. y Cabral, J.R.P. ed.) 261-266.
- 193) Debets, F.M.H., Reinders, J.H., Debets, A.J.M., Lösbroek, T.G., Strik, J.J.T.W.A. y Koss, G. (1981). Toxicology, 19, 185.
- 194) Van Ommen, B., Van Blederen, P.J., Temmik, J.H., y Miller, F. (1985). Biochem. Biophys. Res. Commun, 126,25.
- 195) Stewart, F.P. y Smith, A.G. (1980). IARC Scientific Publications N^o 77 (Morris, C.R. y Cabral, J.R.P. ed.) 325-327.
- 196) Kerklaan, P.R.M., Strik, J.J.T.W.A. (1979). "Chemical Porphyria in Man (Strik, J.J.T.W.A. y Koeman, J.H.ed.) 151-160. Elsevier (North-Holland, Amsterdam).

- 197) Debets, F.M.H., Hamers, W.J.M.B. y Strik, J.J.T.W.A. (1980). *Int. J. Biochem.* 12, 1019.
- 198) Sinclair, P.R. y Granick, S. (1974). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61 (1), 124.
- 199) Lui, H., Sampson, R. y Sweeney, G.D. (1976). *Porphyrin in Human Diseases*, (Doss, M. ed.), Karger, Basel, 405.
- 200) Goldstein, J.A., Friesen, M., Linder, R.E., Hickman, P., Hass, J.R. y Bergman, H. (1977). *Biochem. Pharmacol.* 26, 15.449.
- 201) Waisntok de Calmanovici, R. y San Martín de Viale, L.C. (1980). *Int. J. Biochem.* 12, 1039.
- 202) Debets, F.M.H., Strik, J.J.T.W.A. y Olie, K. (1980), *Toxicology*, 15, 181.
- 203) Rimington, C. y Ziegler, G. (1963). *Biochem. Pharmacol.* 12, 1387.
- 204) Elder, G.H. y Sheppard, D.M. (1982), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 109 (1) 113.
- 205) Ríos de Molina, M. del C., Wainstok de Calmanovici, R. y San Martín de Viale, L.C. (1980). *Int. J. Biochem.* 12, 1027.
- 206) Cantoni, L., Dal Fuime, D., Rizzardini, M. y Ruggieri, R. (1984). *Toxicol. lett.* 20 (2), 211.
- 207) Smith, A.G. y Francis, J.E. (1987). *Biochem. J.* 246, 221.
- 208) Felsher, F.B., Kushner, J.P. (1977). *Semin. Haematol.* 14, 243.

- 209) Ippen, H. (1977). Semin. Hematol. 14, 253.
- 210) Kushner, J.P., Lee, G.R. y Nacht, S. (1972). J. Clin. Invest. 52, 3044.
- 211) Lundvall, O. (1971). Acta. Med. Scand. 189, 51.
- 212) Turnbull, A. (1971). Br. J. Dermatol. 84, 380.
- 213) Elder, G.H., Evans, J.O., Matlin, S.A. (1976), Clin. Sci. Mol. Med. 51, 71.
- 214) Taljaard, J.J.F, Shanley, B.C., Deppe, W.M., Joubert, S.M. (1972), Br. J. Haematol. 23, 587.
- 215) Sweeney, D.G., Jones, K.G., Cole, F.M., Basford, A. y Krestynski, F. (1979). Science, 204, 332.
- 216) Greig, J.B., Francis, J.E., Kay, S.J.E., Lovell, D.P. y Smith, A.G. (1984). Toxicol. appl. Pharmacol. 74, 17.
- 217) Smith, A.G., Stewart, F.P. y Francis, J.E. (1986), IARC Scientific Publication Nº 77 (Morris, C.R. y Cabral, J.R.P. ed.), pp. 433-439.
- 218) Taljaard, J.J.F., Shanley, B.C., Deppe, W.M., Joubert, S.M. (1972), Br. J. Haematol., 23, 513.
- 219) Low, M., Neethling, A.C., Percy, V.A., Carstens, M., y Shanley, B.C. (1977). Clin. Sci. Mol. Med. 53, 111.
- 220) Wainstok de Calmanovici, R., Ríos de Molina, M. del C. y San Martín de Viale, L.C. (1985). Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. 35, 481.
- 221) Hanstein, E.G., Heitman, T.D., Sandy, A., Biesterfeldt, H.L., Liem, H.H., Müller Eberhard, U. (1981). Biochem. Biophys. Acta, 678, 293.

- 222) Felsher, B.F., Norris, M.E., Shih, J.C. (1978). N. Engl. J. Med. 299, 1095.
- 223) De Matteis, F., Stonard, M. (1987). Semin. in Haematol. 14, 187.
- 224) Ferioli, A., Harvey, C., De Matteis, F. (1984). Biochem. J. 224, 769.
- 225) Kalter, S.S. (1963). Procedures for routine laboratory diagnosis of virus and Rickettsiae diseases. (Burgess, 6 ed.). Publishing Co. Minneapolis .
- 226) Ríos de Molina, M. del C. (1982). Porfiria experimental por hexaclorobenceno. Estudios sobre porfirinógeno carboxiliasa y ferroquelatasa. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.
- 227) Keilin, D., Hartree, E.F. (1955). Methods in Enzymology. (Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. ed.). Academic Press, N.Y. vol. 1, pp. 98.
- 228) Mauzerall, D. y Granick, S. (1956). J. Biol. Chem. 219, 435.
- 229) Wainstok de Calmanovici, R. (1982). Porfiria experimental por hexaclorobenceno. Estudios sobre el mecanismo de producción de porfiria. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.
- 230) Tomio, J.M. y San Martín de Viale, L.C. (1972). Bioquim. Clin. 6, 217.
- 231) Rimington, y Sveinsson, S.L., (1950). Scand. J. Clin. Lab. Invest, 2, 209.

- 232) Racz, W.J. y Marks, G.S. (1969). *Biochem. Pharmac.* 18, 2009.
- 233) Falk, J.E. y Benson, A. (1953). *Biochem. J.* 55, 101.
- 234) Salum, J., Batlle, A.M. del C. y Grinstein, M. (1961). *Anales Asoc. Quim. Arg.* 49, 3.
- 235) Doss, M. (1970). *Z. klin. chem. klin. Biochem.* 8, 197.
- 236) Marver, H.S., Tschudy, D.P., PerLroth, M.G. y Collins, A. (1966). *J. Biol. Chem.* 241, 2803.
- 237) Rifkind, A.B., Gillette, P.N., Song, CH. S. y Kappas, A., (1973). *J. Pharmac. exp. ther.*, 185, 214.
- 238) San Martín de Viale, L.C. (1970). *Biosíntesis del hemo. Purificación y caracteización de las porfirinas urinarias en porfiria humana y experimental. Porfirinógenos de 5- y 6-COOH (isómero III) como intermediarios normales en la biosíntesis del hemo. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.*
- 239) Fisher, H. y Stern,,A. (1940). *Die Chemie des Pyrroles*, Leipzig, 2 pt. 2, 420.
- 240) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- 241) Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1981). *Biometry* (Freeman, W.H. ed.). San Francisco, 429.
- 242) *Introduction to Modern Liquid Chromatography 2nd. Edition*, Snyder, L.R. y Kirkland, L.R. (1979). John Wiley and Sons, inc. N.Y.

- 243) Petryka, Z.Y. y Pirach, C.A. (1979). Biological Biomedical Applications of Liquid Chromatography (Howk, G.L., Champlin, P.B., Jordi, H.C., Wenke, D. eds.). Marcel Debker, Inc. (New York and Basel) Vol. 10, 103-121.
- 244) Bonnett, R., Charalambides, A.A., Kevin, J., Magnus, I.A., Kidge, K.J. (1978). Biochem. J. 173, 693.
- 245) Meyer, H.D., Jacob, K. y Vogt, W. (1980). J. of High Res. Chromatogr. & Chromatography Commun. Nº 10.136, pp. 85.
- 246) Meyer, H.D., Jacob, K., Vogt, W., Knedel, M. (1981). J. of Chromatogr. 217, 473.
- 247) Ford, R.E., Du, Chiv Nan y Ellefson, R.D. (1981). Clin. Chem. 27 (3), 397.
- 248) Lim, C.K., Chan, J.J.J. (1982). J. of Chromatogr. 228, 305.
- 249) Smith, R.M., Doran, D., Mazur, M. y Bush, B. (1986). J. of Chromatogr. 181, 319.
- 250) Gray, Ch. H., Lim. C.K. y Nicholson, D.C. (1977). Clin. Chim. Acta 77, 167.
- 251) Straka, J.G., Kushner, J.P. y Burnharm, B.F. (1981). An. Biochem. 111, 269.
- 252) Lim, C.K., Gray, C.H. y Stoll, M.S. (1976). Porphyrin in Human Diseases (M. Doss. ed.), Karger, Basel, 472.
- 253) Rifkind, A.B., Gillette, P.N., Song, C.S. y Kappas, A. (1973). J. Pharmac. exp. ther. 185, 214.
- 254) Jackson, J.K. (1969). Extraction Methods in Toxicology. Isolation and identification of drugs. (Clarke, E.G.C. ed.). London the Pharmaceutical Press, pp. 16-30.

- 255) Koss, G., Seubert, S., Seubert, A., Koransky, W.J., Ippen, H. (1977). Abstract. Joint. Meeting German and a Italian Pharmacologist. Venice, October.
- 256) Koss, G., Seubert, S., Seubert, A., Koransky, W., Ippen, H. y Straub, M. (1979). Chemical Porphyrin in Man. (Strik, J.J.T.W.A., Koeman, J.H. ed.), Elsevier, North Holland, Amsterdam, pp. 175-180.
- 257) Tauba, H., Krupa, V.G., Marks, G.S. (1976). Biochem. Pharmac. 25, 511.
- 258) Lyon, M.E., Owen, J.A. y Marks, G.S. (1988). Biochem. Pharmac. 37, 1123.
- 259) Sinclair, P.R., Bement, W.J., Bonkovsky, H.L., Lambrecht, R., Frezza, J.I., Sinclair, J.F., Urquhart, A.J. y Elder, G.H. (1986). Biochem. J. 37, 63.
- 260) Carpenter, H.M., Harvey, M.J., Buhler, D.R. (1985). J. of Toxicol. an Environm. Health. 15, 81.
- 261) Motoyama, N., Kulkarni, A.P., Holdgson, E. y Dauterman, W.C. (1978). Pestic. Biochem. Physiol. 9, 255.
- 262) Weinbach, E.C. y Garbus, J. (1965). J. Biol. Chem. 240, 1811.
- 263) Straub, H. (1926). Biochem. Z. 178, 167.
- 264) Stewart, F.P. y Smith, A.G. (1987). Biochem. Pharmac. 36, 2232.
- 265) Keberle, H. (1964). Ann. N.Y. Acad. Sci. 119, 758.

- 266) Graziano, J.H., Cerami, A. (1977). *Semin. Haematol.* 14, 127.
- 267) Husain, M.A.M., Green, N., Flynn, D.M., Hussain, S., Hoffbrand, A.V. (1976). *Lancet* 2, 1278.
- 268) Cooper, B., Bunn, H.F., Propper, R.D., Nathan, D.G., Rosenthal, D.S., Moloney, W.C. (1977). *Am. J. Med.* 63, 958.
- 269) Bannerman, R.M., Callender, S.T., Williams, D.L. (1962). *Br. med. J.* 15 diciembre, vol. ii, 1573.
- 270) Timme, A.H., Taljaard, J.J.F., Shanley, B.C., Joubert, S.M. (1974). *S. Afr. med. J.*, 48, 1833.
- 271) Saunders, S.J., Williams, J., Levey, M. (1963). *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.* 9, 277.
- 272) Sinclair, P.R., Bement, W.J., Bonkovsky, H.L. y Sinclair, J.F. (1984). *Biochem. J.* 222, 737.
- 273) Liem, H.H., Smith, A. y Müller-Eberhard, U. (1979). *Biochem. Pharmac.* 28, 1753.
- 274) White, I.N., White, J.A., Liem, H.H. y Müller, Eberhard, U. (1978). *Biochem. Pharmac.* 27, 865.
- 275) De Matteis, F., Sparks, R.G. (1973). *FEBS Letters*, 29, 141.
- 276) Stein, J.A., Tschudy, D.P., Corcoran, P.L., Collins, A. (1970). *J. Biol. Chem.* 245, 2213.
- 277) Abraham, N.G., Camadro, J.M., Hoffstein, S.T., Levere, R.D. (1986). *Biochem. Biophys. Acta*, 870, 339.
- 278) Blekkenhorst, G.H., Day, R.S. y Eales, L. (1980). *Int. J. Biochem.* 12, 1.013.

- 279) De Matteis, F., Harvey, C., Reed, C., Hempenius, R.
(1988). *Biochem. J.* 252, 161.
- 280) Hunter, F.E., Gelicki, J.M., Hoffstein, I.E. y Scott,
A. (1963). *J. Biol. Chem.* 238, 828.
- 281) Utsumi, G. y Yamamoto, M. (1965). *Biochem. Biophys.*
Acta 105, 368.
- 282) Van Stevenick, J., Boegheim, J.P.J., Dubbelman, T.M.A.R.
y Van der Zee, J. (1988). *Biochem. J.* 250, 197.
- 283) Francis, J.E. y Smith, A.G. (1988). *FEBS Letters*, 233, 311.
- 284) Elder, G.H., Roberts, A.G., Urquhart, A.J. (1987).
Ann. N.Y. Acad. Sci., 514, 141.
- 285) Ramsay, C.A., Magnus, I.A., Turnbull, A.J., Baker, H.
(1974). *Q. J. Med. (New Series)*, 43, 1.
- 286) Peters, H.A., Johnson, S.A.M., Cam, S., Oral, S.,
Muftu, Y., Ergene, T. (1966). *Am. J. med. Sci.* 251, 314.
- 287) Thivolet, J., Perrot, H., Malleim, R., Sabater, P.
(1968). *Presse Med.* 76, 367.
- 288) Sinaceur, J., Ribiere, C., Nordmann, J. Nordmann, R.,
(1984). *Biochem. Pharmacol.* 33, 1693.
- 289) Riordan, J.F. y Mac Elvany, K.D. (1977). *Science*, 195, 884.
- 290) David, M., Raschid, I. y Sund, H. (1976). *FEBS Lett.*
62, 288.
- 291) Westhead, E.W. (1972). Dye-sensitized photo-oxidation.
Methods in Enzymology vol. XXV. Enzyme structure. Part
B. (Hirs, C.H.W. y Timasheff, N.T. ed.). Academic Press,
pp. 401-469.

- 292) Miles, E.W. (1977). Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate. Methods in Enzymology vol. XLVII. Enzyme structure. Parte E. (Hirs C.H. W., Timasheff, N.T. ed.). Academic Press, pp. 431-442.
- 293) Batlle, A.M. del C., de Salamanca, R.E., Chinarro, S., Afonso, S.G. y Stella, A.M. (1986). Int. J. Biochem. 18, 143.
- 294) Kurlandska, A., Zoladek, T., Rytka, J., Labbe Bois, R., Urban Grimol, D. (1988). Biochem.J. 253, 109.
- 295) Elder, G.H., Roberts, A.G. y Urquhart, A.J. (1986). Porphyrins and Porphyrins. (Nordman, Y. ed.). 134, 147.
- 296) Francis, J.E. y Smith, A.G. (1987). Biochem. Biophys. Res. Commun. 146, 13.

INDICE

INTRODUCCION.

- Hemo, Biosíntesis del hemo.....	1.
1.- 5-Aminolevúlico sintetasa.....	5.
1.2.- Regulación.....	9.
2.- 5-Aminolevúlico deshidratasa.....	14.
3.- Porfobilinógeno deaminasa-Uroporfirinógeno III. Co-sintetasa.....	17.
4.- Porfirinógeno carboxi-liasa.....	20.
4.1.- Mecanismo de acción.....	20.
4.2.- Cinética.....	23.
4.3.- Características generales.....	26.
4.4.- Purificación.....	26.
4.6.- Estructura de la enzima.....	32.
4.7.- Estudios genéticos. Regulación.....	34.
5.- Coproporfirinógeno oxidasa.....	38.
6.- Protoporfirinógeno oxidasa.....	40.
7.- Ferroquelatasa.....	40.
8.- Degradación del hemo.....	43.
- Porfirias.	
1.- Porfiria congénita eritropoyética.....	46.
2.- Protoporfiria eritropoyética.....	46.
3.- Porfiria aguda intermitente.....	47.
4.- Coproporfiria hereditaria.....	47.
5.- Porfiria variegata.....	48.

6.- Porfiria cutánea tarda.....	48.
6.1.- Porfiria cutánea tarda, modelo experimental. Porfiria inducida por hidrocarburos aromáticos polihalogenados.....	51.
6.2.- Hierro.....	60.

MATERIALES Y METODOS.

- Materiales. Sustratos. Drogas.....	62.
- Métodos.....	63.
1.- Tratamiento de animales.	
1.1.- Ratas.....	63.
1.2.- Embrión de pollo.....	64.
2.- Purificación de porfirinógeno carboxi-liasa de hígado de rata.....	64.
3.- Perfusión de hígado de rata.....	65.
4.- Determinación de ALA, PBG y porfirinas en orina.	
4.1.- Metodología.....	65.
4.2.- Reactivo de Ehrlich.....	66.
4.3.- Determinación de PBG.....	67.
4.4.- Determinación de ALA.....	67.
4.5.- Cálculos.....	67.
4.6.- Determinación de porfirinas.....	67.
5.- Extracción de porfirinas de hígado.	
5.1.- Rata.....	68.
5.2.- Embrión de pollo.....	68.
6.- Esterificación de porfirinas libres.....	69.

7.- Separación de porfirinas metil ester.	
7.1.- Método de Falk y Benson.....	71.
7.2.- Cromatografía en capa delgada por el método de Doss.....	72.
8.- Medición de actividad de ALA-sintetasa hepática.	
8.1.- Rata.....	72.
8.2.- Embrión de pollo.....	73.
9.- Medición de actividad de porfirinógeno carboxi- liasa en hígado de rata.	
9.1.- Preparación de amalgama de sodio.....	73.
9.2.- Preparación de porfirinógeno.....	74.
9.3.- Preparación enzimática.....	74.
9.4.- Medio de incubación.....	75.
10.- Modificación del sitio activo de la PCL .	
10.1.- Reacción con 2,3-butanediona.....	75.
10.2.- Foto-oxidación con azul de metileno.....	76.
10.3.- Reacción con fenilglioal.....	76.
10.4.- Reacción con dietilpirocarbonato de sodio.....	76.
10.5.- Ensayos de protección.....	77.
11.- Determinación de PCL en sangre.....	77.
12.- Determinación de proteínas.....	77
13.- Cromatografía gaseosa.....	78.
14.- Presentación de resultados.....	78.
15.- Tratamiento estadístico.....	78.
<u>OBJETIVOS</u>	79.

RESULTADOS Y DISCUSION.

CAPITULO I.

- Cromatografía líquida de alta presión.

1.- Principios generales.....	80.
2.- Parámetros fundamentales en cromatografía.....	82.
3.- Aplicación a la separación de porfirinas.....	82.
4.- Equipo.....	83.
5.- Solventes.....	84.
6.- Preparación de muestras.....	84.
7.- Resultados y discusión.....	85.

Separación de porfirinas libres en fase reversa.

Tabla IV.....	87.
---------------	-----

- Separación de porfirinas metil ester:

Tabla V.....	89.
Tabla VI.....	90.
Tabla VII.....	91.
Tabla VIII.....	92.

- Calibración - Tabla IX.....

- Tabla X.....	94.
----------------	-----

- Cromatografía líquida de alta presión aplicada a:

medición de PCL a hígado de rata (Fig. 14).....	96.
medición de PCL de eritrocitos humanos (Fig. 15)..	97.
separación de porfirinas urinarias (Fig. 16).....	99.
(Fig. 17).....	101.
(Fig. 18).....	103.
separación de porfirinas hepáticas de embriones de pollo (Fig. 19).....	105.

"Estudios tendientes a elucidar el mecanismo de acción del HCB" (Capítulos II al IV).

CAPITULO II.

A. Rol de los productos metabólicos del HCB y estudios del inhibidor de PCL obtenido de hígado de ratas porfíricas.....	107.
1.- Efecto "in ovo" de los metabolitos del HCB, sobre el camino metabólico del hemo.	
1.1.- Acumulación de porfirinas en embrión de pollo por efecto de metabolitos del HCB.....	108.
a) Efecto del pretratamiento con fenobarbital..	108.
b) Efecto de bencenos menos clorados.....	110.
c) Efecto de metabolitos azufrados.....	110.
d) Efecto de metabolitos fenólicos.....	110.
1.2.- Naturaleza de las porfirinas acumuladas en embrión de pollo por acción de metabolitos del HCB.....	114.
1.3.- Determinación de actividad de ALA-S.....	116.
2.- Efecto "in vitro" de metabolitos del HCB sobre la actividad PCL de hígado de rata.....	116.
3.- Aislamiento y caracterización del inhibidor de PCL obtenido de hígado de ratas porfíricas.....	120.

DISCUSION.

<u>CAPITULO II</u>	137.
--------------------------	------

CAPITULO III.

B. Efectos de un quelante de hierro en la porfiria experimental.....	145.
--	------

1.- Efecto de DF en el desarrollo de la porfiria inducida por HCB.	
1.1.- Diseño experimental.....	146.
1.2.- Resultados.	
a) Excreción urinaria de precursores y porfirinas.....	147.
b) Relación peso del hígado a peso del cuerpo.	150.
c) Acumulación de porfirinas hepáticas.....	150.
d) Actividad enzimática de ALA-S.....	150.
e) Actividad enzimática de PCL.....	152.
f) Efecto "in vitro" de DF en las actividades enzimáticas.....	152.
2.- Evaluación de la capacidad de la desferrioxamina para revertir una severa porfiria inducida por hexaclorobenceno.	
2.1.- Diseño experimental.....	156.
2.2.- Resultados.....	156.
a) Excreción urinaria de precursores y porfirinas.....	157.
b) Acumulación de porfirinas hepáticas.....	159.
c) Actividad enzimática de ALA-S.....	161.
d) Actividad enzimática de PCL.....	161.
<u>DISCUSION.</u>	
<u>CAPITULO III</u>	164.
<u>CAPITULO IV</u>	
D. Estudios del sitio activo de la PCL.....	169.
Foto-oxidación en presencia de azul de metileno.	170.

Efecto de DEPC en la actividad PCL normal y por	170.
fírica.....	172.
Reversión por hidroxilamina y protección por	
Uroporfirinógeno III de la modificación química	
producida por DEPC.....	174.
Efecto de 2,3-butanediona en la actividad PCL	
normal y porfírica.....	174.
Protección por Uroporfirinógeno III de la modi-	
ficación por 2,3-butanediona.....	176.
Efecto de fenilglioxal en la actividad PCL nor-	
mal y porfírica.....	176.
 <u>DISCUSION.</u>	
<u>CAPITULO IV</u>	179.
 <u>CONCLUSIONES</u>	183.
 <u>BIBLIOGRAFIA</u>	187.