

Tesis de Posgrado

Porfobilinógeno deaminasa : caracterización y funcionalidad de la enzima en mamíferos : Avances hacia el conocimiento de la porfiria aguda intermitente

Mazzetti, Marta Blanca

1991

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:

Mazzetti, Marta Blanca. (1991). Porfobilinógeno deaminasa : caracterización y funcionalidad de la enzima en mamíferos : Avances hacia el conocimiento de la porfiria aguda intermitente. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2400_Mazzetti.pdf

Cita tipo Chicago:

Mazzetti, Marta Blanca. "Porfobilinógeno deaminasa : caracterización y funcionalidad de la enzima en mamíferos : Avances hacia el conocimiento de la porfiria aguda intermitente". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2400_Mazzetti.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis:

**Porfobilinógeno deaminasa:
Caracterización y funcionalidad
de la enzima en mamíferos.
Avances hacia el conocimiento
de la porfiria aguda intermitente**

Autora:

Marta Blanca Mazzetti

Directora de Tesis:

Dra. Josefina María Tomio

Lugar de trabajo:

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

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

-1991-

*Tesis
2000*

A todos los inocentes

"Buscamos la esencia que está
detrás de lo azaroso".

Paul Klee

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. J. María Tomio por su constante apoyo y estímulo durante la realización de este trabajo, por todo lo que aprendí con su ejemplo y dedicación y por su infinita tolerancia.

Al Dr. Juan M. Castagnino y a la Dra. Alcira Nesse por su ayuda en el inicio de mi trabajo de investigación.

A mis compañeros de laboratorio Adriana Umansky y Mario Galigniana que colaboraron en la realización de algunas experiencias.

A la Dra. Carlota Wolfenstein-Todel por la determinación de la composición de aminoácidos.

A la Dra. Ana S. Haedo por el asesoramiento estadístico.

A la Sra. Norma Lucero por su cordial y permanente disposición y eficiente ayuda técnica.

A Juan Pablo Vittori por la transcripción de los manuscritos y su peculiar comprensión.

A mis compañeros imprescindibles del Depto. de Química Biológica y a Virginia Scariot por los momentos compartidos y por su amistad.

Al Hospital Italiano y otras Entidades Sanitarias por la provisión de muestras.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por las becas otorgadas.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

TRABAJOS PUBLICADOS

Parte de los resultados presentados en este Trabajo de Tesis dieron origen a las siguientes presentaciones a Congresos Internacionales y publicaciones:

- "Studies on Uroporphyrinogen I Synthetase". Mazzetti, B. y Tomio, J.M. (1985) International Conference on Porphyrin and Porphyria. p.41 Faculté Xavier Bichart, Paris, Francia.

- "Hematin treatment: 7 years of experience". Irigoyen, E., Umansky, A., Mazzetti, M. y Tomio, J.M. (1985) International Conference on Porphyrin and Porphyrias, p.40, Faculté Xavier Bichart, Paris, Francia.

- "Purification and some properties of rat liver Uroporphyrinogen I synthase". Mazzetti, M.B. y Tomio, J.M. (1988) An. Asoc. Quím. Argent. 76, 207-215.

- "Characterization of Forphobilinogen Deaminase from rat liver". Mazzetti, M.B. y Tomio, J.M. (1988) Biochim. Biophys. Acta 957, 97-104.

- "Método simple de aislamiento de enzimas citosólicas hepáticas humanas". Mazzetti, M.B. y Tomio, J.M. (1988) Acta Bioquím. Clin. Latinoam. 12, 509-519.

- "Interacction of metal ions with Porphobilinogen Deaminase". Mazzetti, M.B. y Tomio, J.M. (1989) An. Asoc. Quím. Argent. 77, 71-78.

- "Kinetic and molecular parameters of human hepatic Porphobilinogen Deaminase." Mazzetti, M.B. Y Tomio, J.M. (1990) Biochem. Internat. 21, 463-471.

ABREVIATURAS

AIA	alilisopropilacetamida
ALA	5-aminolevulinato
ALA-D	5-aminolevulinato dehidrasa
cDNA	DNA complementario
cit P-450	citocromo P-450
CMC	1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida
COPRO	coproporfirina
COPRO'geno	coproporfirinógeno
CPG-OX	coproporfirinógeno oxidasa
CRIM	material inmunológico de reacción cruzada
Cs-sC	cistina
Cys	cisteína
Da	dalton
DDC	3,5-dietoxicarbonil-1,6-dihidrocolidina
DOVA	4,5-dioxovalerato
DOVA-T	4,5-dioxovalerato transaminasa
DFMC	cofactor dipirrometano
DTNB	5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato)
DTT	ditiotreitól
Ea	energía de activación
EDTA	ácido etilendiamino-tetraacético
FG	fenilglioxal
Fq	ferroquelatasa
GSH	glutation reducido
GR	glóbulo rojo
Hb	hemoglobina
Hepes	(N-[2-hidroxietyl] piperacina-N'-[2 ácido etanosulfónico])
HMB	hidroximetilbilano
HO	hemo oxigenasa
IACNH ₂	idoacetamida
kb	kilobase

Me	metal
2-Mer	2-mercaptoetanol
NEM	N-etilmaleimida
PBG	porfobilinógeno
PBG-D	porfobilinógeno deaminasa
pI	punto isoeléctrico
PM	peso molecular
pMB	p-mercuribenzoato
PMSF	fenilmetanosulfonilfluoruro
PPG-OX	protoporfirinógeno IX oxidasa
PPL	fosfato de piridoxal
PROTO	protoporfirina
PROTO'geno	protoporfirinógeno
RMN	resonancia magnética nuclear
r_s	radio de Stokes
s	coeficiente de sedimentación
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
Tris	tri(hidroximetil)-aminometano.
U	unidad enzimática
URO	uroporfirina
URO-CoS	uroporfirinógeno III cosintetasa
URO-D	uroporfirinógeno descarboxilasa
URO'geno	uroporfirinógeno
WRK	reactivo K de Woodward

INDICE

	Página
I. Introducción	1
I.1 FUNCIONALIDAD DEL HEMO	1
I.1.1 GENERALIDADES.....	1
I.1.2 PORFIRINAS.....	1
I.1.3 HEMO.....	2
I.1.4 HEMOPROTEINAS.....	4
I.1.4.1 Hemoglobina y Mioglobina.....	6
I.1.4.2 Citocromos.....	7
I.1.4.3 Catalasa y peroxidasa.....	11
I.1.4.4 Triptofano pirrolasa.....	12
I.2 METABOLISMO DEL HEMO Y SU REGULACION	13
I.2.1 BIOSINTESIS DEL HEMO.....	14
I.2.1.1 Biosíntesis de ALA.....	14
I.2.1.2 Biosíntesis de PBG.....	19
I.2.1.3 Biosíntesis de URO'geno III.....	21
I.2.1.4 Biosíntesis de COPRO'geno III.....	25
I.2.1.5 Biosíntesis de PROTO'geno IX.....	27
I.2.1.6 Biosíntesis de PROTO'IX.....	29
I.2.1.7 Biosíntesis de protohemo.....	31
I.2.2 REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO.....	33
I.2.2.1 Regulación en células hepáticas.....	34
I.2.2.2 Regulación en células eritroides.....	38
I.2.3 BIODEGRADACION DEL HEMO.....	40
I.2.3.1 Biodegradación a biliverdina.....	42
I.2.3.2 Biodegradación a bilirrubina.....	46
I.2.4 REGULACION DE LA BIODEGRADACION DEL HEMO.....	48
I.3 PORFOBILINOGENO DEAMINASA	50
I.3.1 GENERALIDADES.....	50
I.3.2 CARACTERISTICAS.....	50
I.3.3 MECANISMO DE LA REACCION.....	55
I.3.3.1 Autopolimerización del sustrato.....	55

I.3.3.2	Identificación del producto de la reacción.....	57
I.3.3.3	Identificación de los complejos enzima-sustrato.....	58
I.3.4	ASPECTOS MOLECULARES.....	62
I.4	PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE.....	65
I.4.1	GENERALIDADES.....	65
I.4.2	MANIFESTACIONES CLINICAS.....	66
I.4.3	RASGOS BIOQUIMICOS.....	68
I.4.4	FACTORES DE PRECIPITACION.....	69
I.4.5	DEFECTO GENETICO.....	69
I.4.5.1	Heterogeneidad molecular de la PAI.....	70
I.4.5.2	Diagnóstico.....	71
I.4.6	TERAPEUTICA.....	73
	Objetivos	75

II. Materiales y Métodos.....76

II.1	MATERIALES.....	76
II.1.1	DROGAS, REACTIVOS Y ACCSESORIOS.....	76
II.1.2	ANIMALES.....	77
II.1.3	MUESTRAS HUMANAS.....	77
II.2	METODOS.....	77
II.2.1	DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PBG-D.....	77
II.2.2	DETERMINACION DE PROTEINAS.....	78
II.2.3	PURIFICACION DE ENZIMAS.....	79
II.2.3.1	Hígado de rata.....	79
II.2.3.2	Hígado humano.....	80
II.2.3.2.1	Eliminación de la contaminación eritrocitaria.....	80
II.2.3.2.2	Purificación.....	82
II.2.3.3	Eritrocitos humanos.....	83
II.2.4	DETERMINACION DEL GRADO DE PUREZA.....	84
II.2.4.1	Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes..	84
II.2.4.1.1	Detección de la actividad enzimática en geles.....	85
II.2.4.2	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes.....	85

II.2.5 DETERMINACION Y CALCULO DE PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS.....	85
II.2.5.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y determinación de PM.....	86
II.2.5.2 Filtración molecular por geles de dextrano y estimación de PM.....	86
II.2.5.2.1 Determinación del radio de Stokes.....	87
II.2.5.3 Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa.....	87
II.2.5.3.1 Medición de proteínas marcadoras.....	88
II.2.5.3.2 Estimación del coeficiente de sedimentación.....	88
II.2.5.4 Cálculo del peso molecular.....	88
II.2.5.5 Cálculo del coeficiente friccional y de la rela- ción axial/ecuatorial.....	89
II.2.5.6 Isoelectroenfoque en gel de agarosa.....	89
II.2.5.6.1 Detección de actividad en geles de agarosa.....	90
II.2.5.6.2 Determinación del punto isoeléctrico.....	90
II.2.6 ANALISIS ESPECTRAL.....	91
II.2.7 ESTUDIOS CINETICOS.....	91
II.2.8 COMPOSICION DE AMINOACIDOS.....	92
II.2.9 ESTUDIOS INMUNOLOGICOS.....	92
II.2.9.1 Producción de anticuerpos.....	92
II.2.9.2 Inmunodifusión en gel.....	93
II.2.9.3 Inmunotitulación y electroinmunoensayo.....	93
II.2.10 ESTUDIO POBLACIONAL.....	94

III. Resultados y Discusión.....96

III.1 PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE PBG-D DE TEJIDO HEPATICO DE MAMIFEROS.....	96
III.1.1 ENZIMA DE HIGADO DE RATA.....	96
III.1.1.1 Purificación.....	96
III.1.1.1.1 Pureza y estabilidad.....	101
III.1.1.1.2 Caracterización.....	104

III.1.1.2.1	Parámetros moleculares e hidrodinámicos.....	104
III.1.1.2.2	Composición de aminoácidos.....	111
III.1.1.2.3	Análisis espectral.....	111
III.1.1.2.4	Análisis cinético.....	111
III.1.2	ENZIMA DE HIGADO HUMANO.....	120
III.1.2.1	Aislamiento: Eliminación de la contaminación eritrocitaria.....	120
III.1.2.1.1	Actividad basal de PBG-D.....	128
III.1.2.2	Purificación.....	129
III.1.2.3	Caracterización.....	136
III.1.2.3.1	Parámetros moleculares e hidrodinámicos.....	136
III.1.2.3.2	Formas moleculares múltiples.....	142
III.1.2.3.3	Análisis cinético.....	145
III.1.2.4	Aminoácidos relacionados con el proceso cata- lítico.....	153
III.1.2.4.1	Efecto de modificadores químicos de aminoáci- dos básicos.....	153
III.1.2.4.2	Efecto de modificadores químicos de aminoáci- dos ácidos.....	160
III.1.2.4.3	Efecto del amonio y de la hidroxilamina.....	168
III.2	PBG-D DE ERITROCITOS HUMANOS.....	171
III.2.1	PURIFICACION.....	171
III.2.2	CARACTERIZACION INMUNOLOGICA.....	172
III.2.2.1	Análisis de la proteína purificada y caracteriza- ción del anticuerpo.....	172
III.2.2.2	Inmunotitulación de la proteína enzimática.....	174
III.2.2.3	Estimación de la inmunorreactividad por electro- inmunoensayo.....	174
III.3	COMPARACION DE LA ENZIMA HEPATICA CON LA ERITROCI- TARIA HUMANA Y LA HEPATICA DE RATA.....	178
III.3.1	PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS.....	178
III.3.1.1	Actividad basal.....	178
III.3.1.2	Parámetros moleculares e hidrodinámicos.....	181
III.3.1.3	Fuerza iónica.....	182

III.3.1.4	Parámetros cinéticos.....	183
III.3.2	PROPIEDADES INMUNOLOGICAS.....	185
III.3.3	EFEECTO DE LIGANDOS SOBRE AMINOACIDOS DE PBG-D.....	186
III.3.3.1	Reactivos tiólicicos.....	186
III.3.3.2	Fosfato de piridoxal.....	192
III.3.3.3	Cationes.....	195
III.3.4	NATURALEZA DE GRUPOS FUNCIONALES DE PBG-D.....	207
III.4	ANALISIS POBLACIONAL.....	213
III.4.1	DIAGNOSTICO.....	213
III.4.1.1	Metabolitos hémicos.....	215
III.4.1.2	Actividad eritrocitaria de PBG-D.....	216
III.4.1.3	Dosaje de proteína inmúnorreactiva.....	220
III.4.1.4	Perfiles de isoelectroenfoque de PBG-D eritrocitaria.....	223
III.4.2	HEMATINA: SEGUIMIENTO DE LA TERAPIA.....	226
Conclusiones		232
IV. Bibliografía		237

I. Introducción

I.1 FUNCIONALIDAD DEL HEMO

I.1.1 GENERALIDADES

El hemo es el metabolito central del metabolismo de las porfirinas y de los pigmentos biliares. Cada una de las etapas de su síntesis y degradación han sido y son objeto de múltiples investigaciones, así como sus roles fisiológicos, cuyo espectro se amplía permanentemente. En el reino animal, sus funciones son múltiples, actuando tanto en forma libre como formando parte de proteínas conjugadas. Químicamente, el hemo es una hierro-porfirina.

I.1.2 PORFIRINAS: Macrociclos tetrapirrólicos

Las porfirinas están constituidas por cuatro subunidades pirrólicas, con diferentes sustituyentes en sus cadenas laterales β , unidas por puentes metinos, que conforman un macrociclo.

Los sistemas de nomenclatura que se utilizan son los propuestos por Fisher (1) y la IUPAC-IUB (2) y que difieren en la numeración de los átomos de carbono y de nitrógeno del anillo tetrapirrólico. En el primero y más tradicional, a la estructura básica cíclica del cual derivan todas las porfirinas conocidas se la denomina "porfina" (Fig.1a), mientras que en la más reciente nomenclatura, se la denomina "porfirina" (Fig. 1b). En los compuestos naturales, los hidrógenos de las posiciones β de los anillos pirrólicos se encuentran sustituidos por distintos grupos alquilo, lo cual le confiere una amplia y compleja diversidad a estas estructuras.

Aunque las porfirinas libres se encuentran en la naturaleza en pequeñas cantidades, hasta el presente no se conocen funciones específicas asignadas a las mismas; mientras que hemos, clorofilas y corrinas -compuestos naturales en los cuales los tetrapirroles están quelados con Fe, Mg y Co respectivamente- llevan a cabo funciones biológicas cruciales.

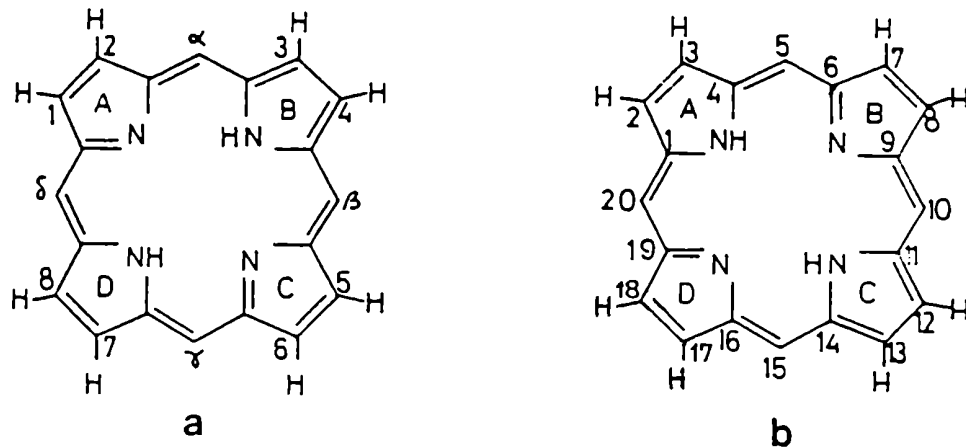


FIG.1: ESTRUCTURA Y NOMENCLATURA DEL MACROCICLO TETRAPIRROLICO BASICO.

a) Porfina (numeración de Fisher); b) Porfirina (numeración "1-24" de IUPAC-IUB).

I.1.3 HEMO: Metaloporfirina ubicua

El hemo o protohemo es un pigmento rojo que constituye la más ubicua de las metaloporfirinas en el reino animal.

Está formado por una estructura anular tetrapirrónica conocida como protoporfirina (tipo IX, isómero III) que tiene insertado en el centro del anillo un átomo de hierro (Fig.2). Es precisamente este metal de transición, debido a su valencia de coordinación y a su habilidad de experimentar cambios en su estado de reducción ($Fe^{2+} \rightleftharpoons Fe^{3+}$) el que confiere al hemo la posibilidad de desempeñar múltiples funciones en los sistemas

fisiológicos, como el ser intermediario y catalizador en los procesos de transporte y transferencia de electrones o cargas, oxígeno, etc. Sin embargo, el hierro es responsable sólo en parte de estas propiedades, las que se ven notablemente favorecidas por su unión a la porfirina y selectivamente más aún, por la unión del hemo a apoproteínas específicas; las que así aumentan la actividad catalítica del metal libre en un rango de 5 a 10 órdenes de magnitud y controlan la reactividad inherente de la metaloporfirina (3).

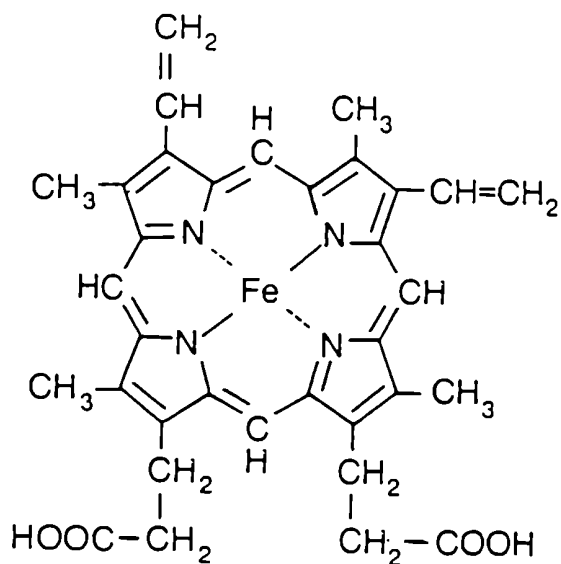


FIG.2: ESTRUCTURA DEL HEMO, PROTOHEMO O FERROPROTOPORFIRINA IX.

El hemo como tal o como integrante de sistemas enzimáticos cumple funciones y tiene localizaciones subcelulares muy diversas. El hemo "libre" -formando parte de "pooles" específicos- es un efector que controla múltiples mecanismos. Actúa así, como regulador de su propia síntesis a diferentes niveles, como inductor de su propia degradación, como efector

alostérico de enzimas del proceso proteolítico, como modulador de enzimas transductoras (se lo considera como un segundo mensajero) o de vías metabólicas como la biosíntesis de proteínas en estadios tempranos, como estimulador de la síntesis de hemoproteínas, como modificador del desarrollo y la diferenciación celular, y en la captación y liberación de metabolitos, a veces, mediante la expresión de receptores específicos (4). Participa también, como grupo prostético de un gran número de holoproteínas como hemoglobina (Hb), mioglobina, citocromos, enzimas y como coenzima de proteínas que catalizan transformaciones relativamente complejas de diversos sustratos y de la producción de GMP cíclico.

I.1.4 HEMOPROTEINAS: Proteínas conjugadas con hemo, con conformaciones diversas que les permiten cumplir actividades muy variadas.

Las metaloporfirinas son los derivados por medio de los cuales las porfirinas intervienen en los procesos biológicos. Poseen, sin embargo, una propiedad que conspira contra este propósito como es la de formar agregados de elevado peso molecular. Esta capacidad de agregación da origen, en el caso del hemo, a la formación de los llamados "complejos π ", de pesos moleculares (PM) del orden de 10^4 - 10^5 . Para evitar esta autoagregación, la evolución biológica ha insertado a las unidades monómeras hémicas en estructuras proteicas, dando lugar a la formación de hemoproteínas. Esta inserción en cavidades o sitios hidrofóbicos de proteínas impide la autopolimerización de la metaloporfirina y permite así su función biológica.

Concomitante con la naturaleza múltiple de sus funciones biológicas, las diversas familias de hemoproteínas poseen hemos con grupos de coordinación distintivos y patrones característicos de sustitución periférica sobre la unidad

porfina. Cada una de las cuatro combinaciones posibles del ión hierro -ferroso o férrico- en su estado fundamental -alto o bajo spin (número de giro)- da cuenta de uno o más de los hemos presentes en la naturaleza, sin embargo, ninguno de estos tiene un duplicado químico exacto entre los ya analizados. Por lo tanto, lo más importante es reconocer que la estereoquímica de los grupos de coordinación sigue principios estructurales bien definidos, que prevalecieron a través de la evolución (5).

Consistente con la relación estructura y función, Castro (6) propuso mecanismos de acción para las hemoproteínas mediante la formulación de un conjunto mínimo de conformaciones proteicas, las que permiten en parte, explicar la variada actividad exhibida por las mismas. Estas conformaciones formuladas en dos dimensiones se denominan tipo "G", "C" o "C corta" (Fig.3). Según estos modelos, el borde del plano de la porfirina se dibuja en línea gruesa y perpendicular al plano del papel. Los ligandos axiales del Fe^{2+} que están por arriba y abajo del plano de la porfirina, se dibujan en el plano del papel y se indican como "L".

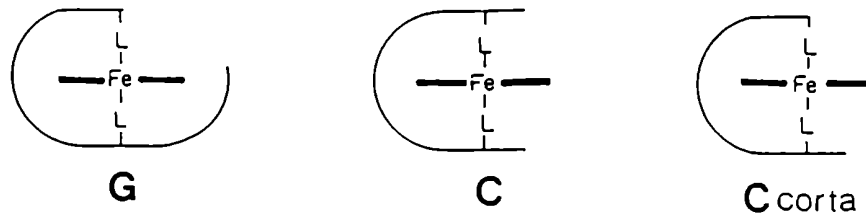


FIG.3: CONFORMACIONES PROTEICAS DE LAS HEMOPROTEINAS.

La conformación "G" (tipo globina) que reflejaría en forma simplificada la estructura terciaria de una hemoproteína como

Hb o mioglobina, tendría un ligando axial del Fe accesible a sustitución, mientras que la periferia del anillo porfirínico, incluidos sus sustituyentes voluminosos, se encontraría cooperativamente bloqueada por la proteína. En contraste, la conformación "C" (tipo citocromo C) presentaría las posiciones axiales del metal difícilmente accesibles por la envoltura proteica, pero la periferia de la porfirina estaría expuesta. En la conformación "C corta" (tipo catalasa) una posición axial y la periferia del macrociclo estarían accesibles para la reacción.

En base a esta teoría puede ser explicada la reactividad de las distintas hemoproteínas frente al oxígeno, peróxido de hidrógeno y en algunos casos, su comportamiento frente a diferentes sustratos orgánicos (6).

I.1.4.1 Hemoqlobina y mioglobina

Constituyen dos de las hemoproteínas mejor caracterizadas. La mioglobina, proteína monomérica compacta, tiene capacidad de almacenar oxígeno en el músculo y contribuye a la difusión de oxígeno en los tejidos, en condiciones de un metabolismo oxidativo incrementado. El hemo de la Hb contribuye a la mayor parte (70%) del hemo total existente en organismos superiores (mamíferos)(7). Es una proteína tetramérica cuya función principal es la de transportar oxígeno y también, dióxido de carbono e ión hidrógeno. Une además, compuestos orgánicos fosforilados que regulan su capacidad de unir y liberar O₂. Su naturaleza tetramérica ejerce una influencia especial sobre la cinética total de reacción con sus ligandos, respondiendo los cuatro sitios a velocidades diferentes (8).

Cualitativamente, sin embargo, la Hb y mioglobina exhiben una reactividad similar, lo cual es consistente con la unión idéntica en la esfera de coordinación que el hierro presenta en ambas proteínas y con la similitud del ordenamiento proteico de

sus sitios activos.

El rol fisiológico de estas proteínas es la oxigenación reversible de los complejos de Fe^{2+} . La conformación "G" propuesta (6) resulta esencial para explicar el fenómeno de estabilidad de los aductos formados con la hemoproteína. Los complejos oxigenados son estables debido a que esta conformación impide el ataque por otro grupo hemo y el proceso de oxidación del hierro mientras el O_2 está coordinado al Fe^{2+} . Sin embargo, la interacción de la Hb con el O_2 produce secundariamente una oxidación química del Fe^{2+} a Fe^{3+} , formándose metahemoglobina, que puede aceptar como ligandos, aniones dadores de electrones (H_2O , OH^- , CN^-) pero no un gas. Una enzima, la metahemoglobina reductasa dependiente de NADH es capaz de regenerar hemoglobina.

I.1.4.2 Citocromos

Genéricamente se denomina así a un grupo de cromoproteínas transportadoras de electrones que están localizadas en mitocondrias (citocromos b, c_1 y aa_3) y en el retículo endoplasmático (citocromo b_5 y P-450).

La catálisis redox se hace por oxidación y reducción alternada del átomo de hierro. Se diferencian por la naturaleza del grupo hemo (variaciones en sus sustituyentes laterales β y/o uniones), su potencial redox estándar y su espectro de absorción (9).

Citocromo b: Se conoce la existencia de por lo menos dos hemoproteínas que cumplen esta función en mitocondrias de animales, con máximos de absorción a 560-565 nm. Están fuertemente ligadas a la membrana mitocondrial interna. Los hemos estarían unidos a la proteína por una combinación de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas y por uniones coordinadas al ión metálico, como en el caso de la Hb (10).

Citocromo c_1 : Es un constituyente integral de la membrana

interna mitocondrial. Poco se conoce del mismo. Tiene un máximo de absorción a 552 nm y su oxidación produce a través de una interacción hemo-hemo, un cambio en el potencial del citocromo b₇ (citocromo b que absorbe a 565 nm) siendo así su propio regulador.

Citocromo c: Es una de las hemoproteínas mejor estudiadas (11) y su estructura ha sido totalmente dilucidada. La molécula es un esferoide prolado con un PM cercano a 13.000.

Constituye una conexión fundamental en la cadena de transporte de electrones mitocondrial, ya que es una proteína periférica de la membrana interna que transfiere electrones del sistema reductasa, inmovilizado en la membrana (cit b y c₁) al complejo oxidasa (cit a+a₃). Su estructura terciaria depende del estado de oxidación del hierro que alterna entre las formas Fe²⁺(s=0) y Fe³⁺(s=1/2). El hemo está unido covalentemente por los restos vinilos a la proteína, a través de dos enlaces tioéteres (cisteínas) y mediante uniones electrostáticas de ligandos axiales (histidina y metionina) con el hierro (conformación "C"). Forma compuestos con fosfolípidos que le son imprescindibles para su integración a la membrana. Su mecanismo de acción ha sido objeto de numerosas hipótesis: las que favorecen la intervención directa de las proteínas en el proceso de transporte y las que hacen recaer la acción redox del citocromo, exclusivamente en la hierro-porfirina. En este caso la proteína actuaría como agente facilitador del proceso de transferencia de electrones entre los complejos b+c y a+a₃, disminuyendo la barrera de potencial entre los centros de las hierro-proteínas. Existen, sin embargo, otras hipótesis formuladas (12).

Citocromo a+a₃ o citocromo oxidasa: es la oxidasa terminal presente en todos los organismos aeróbicos. En células eucarióticas, la proteína está localizada en la membrana interna mitocondrial inserta en la bicapa lipídica. Su función es la de combinarse con el oxígeno -de modo semejante a la Hb-

y reducirlo a dos moléculas de agua. Para ello, la enzima contiene cuatro aceptores de electrones: dos hemos que difieren en sus sustituyentes β y dos átomos de Cu^+ esenciales, insertos en un complejo multipeptídico que tiene unidos fosfolípidos, tipo cardiolipina. El complejo está constituido por siete cadenas peptídicas de diferentes pesos moleculares y la subunidad activa sería de 290.000 daltons (13 y referencias citadas). Los dos hemos están unidos a la proteína en sitios distintos, el componente a se ubica hacia el lado externo de la membrana y el a_3 hacia la cara interna de la misma, lo que determina condiciones de reactividad diferencial de ambos grupos. Así el hemo a, ligado a la proteína a través de dos histidinas, y el Cu_a son los aceptores del primer par de electrones que entra al complejo, haciéndolo de forma similar al citocromo c (conformación "C").

El hemo a_3 ligado por una sola histidina, junto con el Cu_{a3} , conectados por un ligando común forman el sitio de unión del oxígeno (14). El hemo a_3 no sólo reacciona con el oxígeno sino también con inhibidores como cianuro, monóxido de carbono, azida, etc. y sus espectros característicos lo asemejan al hemo de la Hb (conformación "G").

Citocromo b_5 : Es uno de los tres componentes de un sistema enzimático y transportador de electrones del retículo endoplasmático que funciona desaturando ácidos grasos. Sus funciones principales parecen ser la de activar el oxígeno molecular y mantener un medio reductor. El grupo prostético es un protohemo que no está unido covalentemente a la proteína sino a través de sus ligandos axiales (2 histidinas). Su estructura es siempre octaédrica tetragonal de bajo spin (conformación tipo "C"). Durante su funcionamiento redox el Fe^{2+} pasa a Fe^{3+} y viceversa, sin perder su planaridad (6).

Citocromo P-450: Bajo este nombre se agrupa una familia muy importante de hemoproteínas presentes en mamíferos, anfibios, levaduras, insectos, bacterias y plantas superiores

que pertenecen a la clase de enzimas llamadas monooxigenasas, oxigenasas u oxidasas de función mixta, ya que son aparentemente bifuncionales. Se comportan como oxigenasas en un sitio y como reductasas de oxígeno en el otro, catalizando la incorporación de un átomo de oxígeno molecular al sustrato mientras que otro es reducido a agua. Químicamente pertenecen al grupo de citocromos b y tienen como característica distintiva la capacidad de combinarse con CO, presentando un máximo de absorción típico a 450 nm. Se encuentran localizadas en las membranas del retículo endoplásmico integradas al sistema de transporte de electrones para intervenir en reacciones de hidroxilación y desaturación.

La función fisiológica primordial del citocromo P-450 es la conversión de múltiples drogas, mutágenos, carcinógenos y otras sustancias tóxicas en compuestos con mayor carácter hidrofílico y por ende, más fácilmente excretables por el organismo. Sin embargo, se ha reconocido recientemente, que algunas transformaciones metabólicas mediadas por el citocromo P-450 (cit P-450) conducen a la formación de productos tóxicos o carcinogénicos (15). Los diferentes compuestos, dependiendo de su estructura, pueden ser biotransformados en una variedad de metabolitos intermedios vía N-, O-, S-desalquilación, hidroxilación aromática y/o alifática, desaminación, epoxidación, transferencia oxidativa de grupos, destrucción suicida de olefinas, etc. (16).

Estas hemoproteínas están también involucradas en la biosíntesis de hormonas esteroides (sexuales y corticosteroides), ácidos biliares y en el procesamiento hacia sus formas activas de prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienes y vitamina D (7, 17). Los cit P-450 involucrados en la esteroidogénesis muestran una mayor especificidad por sus sustratos y tienen además localización mitocondrial (17).

Las diferentes formas de cit P-450 están compuestas por una multiplicidad de proteínas que tienen como grupo prostético al

protohemo que se ubica en una hendidura hidrofóbica, donde también se encuentra el sitio de unión del sustrato. El hierro del hemo es capaz de formar seis enlaces coordinados, siendo en este caso los ligandos axiales el azufre de una cisteína de la cadena polipeptídica y el otro generalmente agua, cuando no se halla presente el sustrato. En ausencia de sustrato, el hierro se halla al estado férrico de bajo spin. La presencia de sustrato induce un cambio conformacional que determina la pérdida del sexto enlace coordinado del hierro férrico y un pasaje al estado de alto spin que conlleva un desplazamiento del hierro desde el plano del macrociclo hacia el grupo tiólico (17).

Todos los citocromos utilizan el mismo ciclo catalítico en la hidroxilación de sustratos lipofílicos, pudiendo éste considerarse como una secuencia de siete pasos que utilizan al hemo como sitio interactuante. Comprende: 1) la formación estequiométrica rápida del complejo enzima(Fe^{3+})-sustrato, 2) la adición del primer electrón, 3) la unión del oxígeno molecular, 4) la adición del segundo electrón, 5) el clivaje del oxígeno para dar agua, 6) la inserción del oxígeno en el sustrato, 7) la disociación del producto hidroxilado dejando al hierro en el estado original (16, 17).

Hasta el momento, estudios sobre la superfamilia de los citocromos P-450 han permitido la caracterización de 71 genes y 4 pseudogenes provenientes de organismos pro y eucarióticos (18).

I.1.4.3 Catalasa y peroxidasa

Ambas enzimas pertenecen al grupo de las hidroxiperoxidasas ya que utilizan el peróxido de hidrógeno como sustrato.

La catalasa, ha sido la primera de las hemoproteínas reconocida como enzima (19). Cataliza la dismutación del agua oxigenada -que se obtiene como producto de la acción de las

deshidrogenasas aeróbicas y de la superóxido dismutasa- en agua y oxígeno molecular (20). Se encuentra en la sangre y en el hígado, en los peroxisomas.

Es una proteína tetramérica, conteniendo un grupo hemo en cada subunidad, sin embargo, sólo uno de ellos es reactivo en el proceso.

De acuerdo al modelo de Castro (6) el complejo se encuentra en la configuración "C corta" de alto spin en la que tanto uno de los ligandos axiales del Fe^{3+} como la periferia del anillo porfirínico son fácilmente accesibles. Por lo tanto, la adición oxidativa del peróxido de hidrógeno al hierro y a un C meso de la porfirina ocurre sin impedimentos y su mecanística explica la inusual reactividad de esta enzima.

Las peroxidases son las más ubicuas de todas las hemoproteínas y están ampliamente distribuidas en plantas y tejidos animales. Poseen al protohemo como grupo prostético.

La naturaleza general de la reacción que catalizan es la oxidación de moléculas orgánicas por eliminación de hidrógeno. No muestran marcada especificidad en cuanto a los dadores de hidrógeno y los requerimientos salientes del sustrato son la posesión de enlaces del tipo C-H, N-H, O-H, S-H, etc., con suficientemente baja energía de disociación para permitir que el proceso continúe.

Las características estructurales son similares a las de las catalasas y corresponden a las de una proteína con un macrociclo porfirínico con Fe^{3+} (alto spin) y configuración "C corta", es decir con un ligando axial disponible, al igual que la periferia de la porfirina, pero forma complejos inestables transientes (6) pudiendo actuar como donador endógeno, un hidroxilo fenólico de una tirosina.

I.1.4.4 Triptofano pirrolasa

Esta hemoproteína presente en mamíferos y bacterias

cataliza la degradación del aminoácido esencial L-triptofano mediante un clivaje oxidativo a formilquinurenina.

Su grupo prostético es el protohemo y pertenece al grupo de las dioxigenasas intramoleculares, ya que ambos átomos del oxígeno molecular son incorporados al sustrato. El complejo ferroso de la enzima forma rápidamente un aducto con el O₂ que es estable, lo que sugeriría una configuración "G" de la proteína (6). La mayor reactividad de la enzima se explicaría como una adición cíclica (2+2) de oxígeno a la unión doble del triptófano.

Esta enzima cumpliría un rol biológico importante en la regulación de la producción de hemo hepático, mediante el control del "pool" de hemo libre (21).

I.2 METABOLISMO DEL HEMO Y SU REGULACION

I.2.1 BIOSINTESIS DEL HEMO:

En animales superiores el hemo se sintetiza primordialmente en los tejidos hematopoyéticos y en el hígado. El camino está conformado por una serie de reacciones catalizadas enzimáticamente -en diferentes compartimentos subcelulares- que partiendo de moléculas muy simples originan estructuras más complejas por condensación y polimerización de unidades repetitivas, que se ciclizan y modifican para favorecer su adaptación evolutiva.

Los trabajos pioneros que han llevado a la identificación de los precursores: glicina succinil-CoA, 5-aminolevulinato, porfobilinógeno e intermediarios porfirinogénicos, así como de la mayoría de las etapas enzimáticas, pertenecen a los grupos de Shemin, Rimington, Granick, Bogorad y Neuberger (22 y referencias citadas).

La biosíntesis del hemo requiere de ocho moléculas de

glicina y de succinil-CoA así como de ocho enzimas, siendo de localización mitocondrial la primera y las tres últimas, mientras que las intermedias son citosólicas (Fig.4).

El primer intermediario es el 5-aminolevulinato (ALA) una aminoacetona de cinco átomos de carbono, que se forma por condensación de glicina y succinil-CoA y que es el precursor obligado de todas las porfirinas y hemos. Dos moléculas de ALA se condensan para formar el monopirrol heterocíclico porfobilinógeno (PBG). Luego, cuatro moléculas de PBG se polimerizan secuencialmente para formar tetrapirroles cíclicos: uroporfirinógeno I y III (URO'geno I y III). El macrociclo serie isomérica III -precursor fisiológico del hemo- se convierte en coproporfirinógeno III (COPRO'geno III) por descarboxilación secuencial de sus cadenas β laterales, y finalmente en protoporfirinógeno IX (PROTO'geno IX), que por deshidrogenación produce protoporfirina IX (PROTO IX). Con la excepción de la protoporfirina, los verdaderos intermediarios tetrapirrólicos de esta síntesis son los porfirinógenos, estructuras inestables al aire que constituyen los hexahidros derivados de las porfirinas correspondientes (23).

En prácticamente todos los seres vivos la protoporfirina es el precursor inmediato del hemo al coordinarse con el ión ferroso (Fe^{2+}), mientras que en los organismos fotosintéticos lo es de las clorofilas y bacterioclorofilas, al coordinarse con el Mg^{2+} . En algunos microorganismos el URO'geno III sufre también una metilación reductiva para transformarse en sirohidroclorina, compuesto precursor de la vitamina B_{12} , del sirohemo (24) y del factor F_{430} (25). Algunos organismos, como los hemoflagelados, necesitan de una fuente exógena de hemo para sus hemoproteínas (26).

1.2.1.1 Biosíntesis de ALA

El ALA se forma en la matriz mitocondrial por condensación

MITOCONDRIA

CITOPLASMA

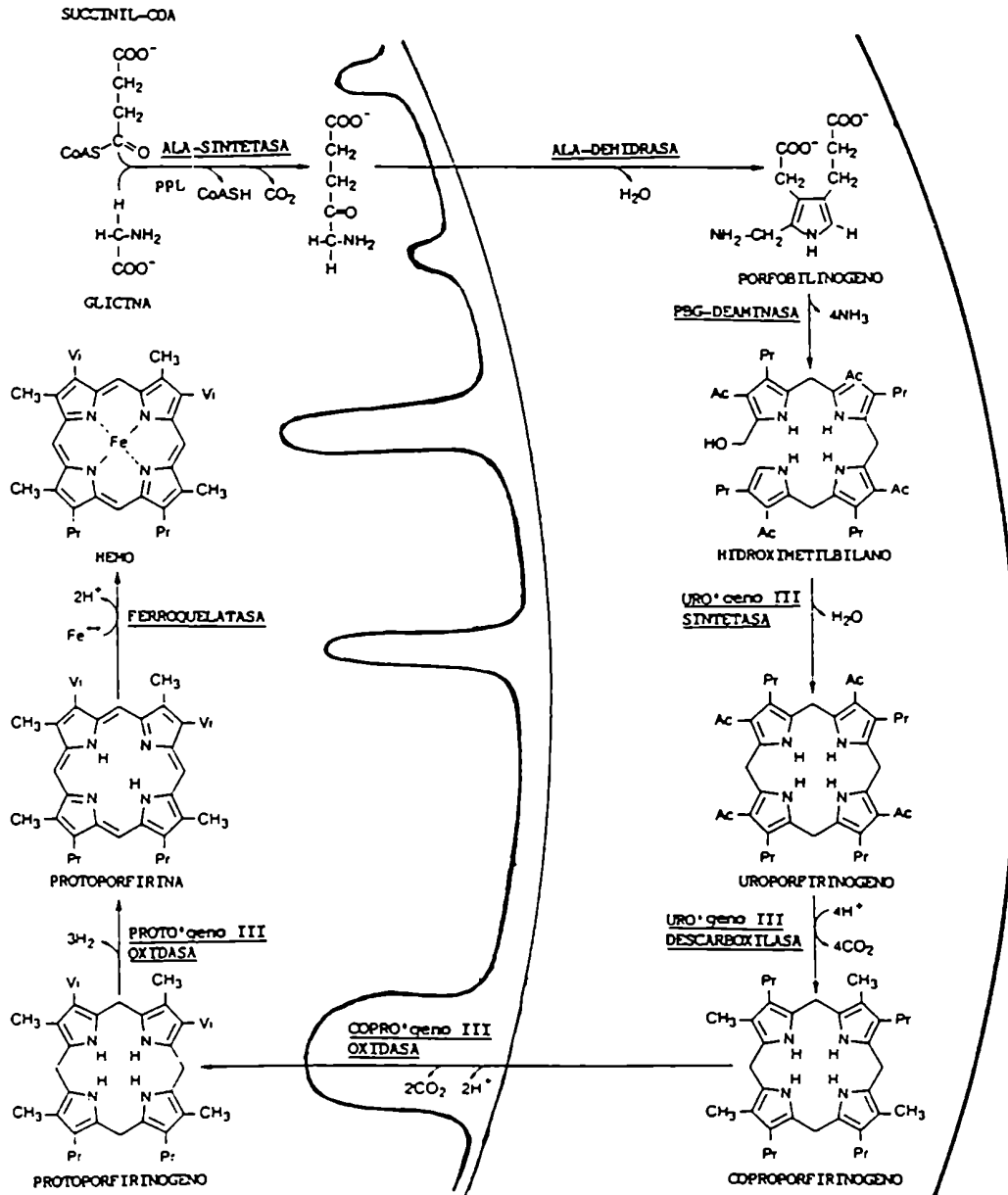


FIG.4: CAMINO BIOSINTETICO DEL HEMO.

PPL, fosfato de piridoxal; CoASH, succinil-CoA; ALA, 5-aminolevulinato; PBG, porfobilinogeno; URO'geno, uroporfirinogeno; COPRO'geno, coproporfirinogeno; PROTO'geno, protoporfirinogeno; Ac, acetato; Pr, propionato; Vi, vinilo.

de una molécula de glicina con una de succinil-CoA, catalizada por la enzima 5-aminolevulinato sintetasa, [(ALA-S) succinil-CoA:glicina C-succinil transferasa (descarboxilante); EC 2.3.1.37]. Su presencia ha sido demostrada en una amplia variedad de fuentes como bacterias, levaduras y diferentes tejidos de aves, insectos y mamíferos (27, 33).

La enzima requiere fosfato de piridoxal (PPL) como cofactor y su mecanismo de reacción ha sido elucidado utilizando ALA-S purificada de diferentes fuentes (34-36). El PPL se une a la enzima y la glicina se condensa con el complejo enzima-PPL formando un carbanión estable con remoción del hidrógeno (configuración R) del átomo de carbono 2 del aminoácido. Se produce entonces la condensación con el carbonilo electrofílico de la succinil-CoA y se forma el intermediario inestable α -amino- β -cetoadípico, que se descarboxila espontáneamente para dar ALA. Nuevamente se conserva en el producto final el hidrógeno (configuración S) de la glicina original.

La ALA-S ha sido localizada en la matriz mitocondrial de hepatocitos de rata (37) y si bien los valores de actividad detectados son extremadamente bajos, la administración de drogas porfirinógenicas, en especial alilsopropilacetamida (AIA) y 3,5 dietoxicarbonil-1,4-dihidrocolidina (DDC) producen un considerable aumento y acumulación de la actividad de la enzima en el citosol (38-43). Este incremento puede ser prevenido con cicloheximida y mitomicina C pero no con cloranfenicol (38). Estos datos permitieron demostrar que tanto la enzima mitocondrial como la citoplasmática se sintetizan en polirribosomas del citosol, representando esta última una forma enzimática precursora en tránsito hacia la mitocondria, donde funciona fisiológicamente.

Su purificación y caracterización resultó dificultosa debido a que se encuentra en cantidades pequeñas, a su conocida inestabilidad y a la propiedad de agregarse con ella misma o con otras proteínas. Esto sumado a las variaciones en las

condiciones experimentales utilizadas determinó un amplio rango de valores en los pesos moleculares informados para ambas formas subcelulares, siendo generalmente mayores los de la citoplasmática (41-44). La enzima parcialmente purificada de mitocondrias de hígado de conejo, rata y cobayo exhiben valores de K_m en el rango 5 a 19 mM, 60 a 200 μ M y 1 a 10 μ M para glicina, succinil-CoA y PFL respectivamente (41, 45-48).

La enzima citosólica purificada en presencia de papaína, a partir de tejido hepático de rata tratada con AIA mostró por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) un PM mínimo de 51.000 y de 110.000 por ultracentrifugación en gradiente de sacarosa; concluyéndose que funciona como un homodímero (49). Yamamoto y col. (50) informaron para la misma enzima inducida un valor de 77.000 y para la mitocondrial 66.000. El análisis de los clones de cDNA de ALA-S eritoride obtenidos, permitieron predecir una proteína de 54.804 Da de masa molecular (51).

El estudio de la estructura de la ALA-S hepática de embrión de pollo por microscopía electrónica permitió deducir que la enzima consiste en dos subunidades idénticas y curvadas, asociadas en polaridades opuestas y de sus dimensiones se estima una masa molecular relativa de 70 kDa (52). Nakakuki y col. (49) sugirieron la existencia de enzimas tisulares diferentes en reticulocitos y hepatocitos de rata, hipótesis que fue avalada por el comportamiento diferencial observado para ambas enzimas, de diferentes fuentes, frente a inductores porfirinogénicos (53) y regulación por hemo (54) y corroborada por las características diferenciales en tamaño molecular y propiedades cinéticas (55, 56). Se propuso también, la existencia de mRNAs diferentes en células hepáticas y eritroides de pollo, sugiriendo la existencia de genes separados que producirían isoformas estructuralmente relacionadas con diferentes PM (57). Esto fue confirmado por Riddle y col. (51) quienes mediante la secuenciación y

comparación de los cDNAs completos para ambas proteínas informaron que al menos dos genes diferentes codifican las dos isoformas y que el producto del gen eritroide se expresa exclusivamente en ese tipo de células, mientras que el del hepático es ubicuo, sugiriendo su presencia en todos los tejidos. Observaron además que sondas de ambos cDNAs detectaban perfiles de bandeado cromosomal únicos y no superpuestos, prueba de que las dos isoenzimas se transcriben de "loci" genómicos separados. Las secuencias de aminoácidos deducidas para ambas proteínas son muy similares en la zona intermedia y carboxi-terminal, pero muy poco en la zona amino terminal. Bawden y col. (59) han clonado y secuenciado el cDNA de la enzima hepática humana y Bishop y col. (59) han localizado el gen humano ubicuo de ALA-S en el cromosoma 3 y el gen específico eritroide en el cromosoma X.

La producción de ALA en mamíferos parece estar catalizada, además, a través de una transaminación irreversible, por otra enzima, la L-alanina:4,5-dioxoalderato transaminasa [(DOVA-T); EC 2.6.1.44]. De esta forma el 4,5-dioxoalderato (DOVA) se incorpora a las porfirinas y al hemo. Es una enzima localizada en la matriz mitocondrial con subunidades de PM 146.000 y ha sido estudiada en hígado de cerdo, rata y ratón (60-62). Igual que la ALA-S, es inhibida por hemo "in vivo" e "in vitro" (63). A pesar de que la capacidad de producir ALA en el hígado parece mucho mayor que la de la ALA-S su contribución fisiológica a esta producción no se conoce, así como no se ha establecido fehacientemente la presencia del sustrato en mitocondrias de mamíferos (62, 64).

Estudios "in vitro" han revelado que el Co^{2+} puede catalizar la formación del ALA a partir de L-alanina y DOVA, mediante una reacción de transaminación no-enzimática. La misma puede ser inhibida por protoporfirina pero no por hemo (65).

I.2.1.2 Biosíntesis de PBG

El ALA formado en la mitocondria se transporta al citoplasma donde dos moléculas se condensan asimétricamente para formar el pirrol PBG con liberación de dos moléculas de agua por acción de la 5-aminolevulinato dehidrasa [(ALA-D); ALA-hidrolasa; PBG-sintetasa; EC 4.2.1.2.4].

La enzima ha sido purificada de una gran variedad de fuentes incluyendo bacterias, hongos, plantas, aves y mamíferos (66-77).

Las ALA-D de diversas fuentes de mamíferos tienen PM entre 250.000 y 285.000 y están compuestos de ocho subunidades idénticas de aproximadamente 35 kDa que conforman una estructura cúbica octamérica con simetría dihédrica D_4 (78).

Entre las características de esta enzima se hallan su relativa termoestabilidad y marcada sensibilidad al oxígeno. Esta propiedad está asociada a la presencia de residuos de cisteína de alta reactividad, que son requeridos para la estabilidad y actividad de la misma (79-81). Estos grupos pueden ser mantenidos en su estado reducido por la presencia de altas concentraciones de activadores tiólicos (82). Se ha sugerido que otros aminoácidos jugarían un importante rol en la actividad de la enzima siendo los más significativos lisina (83) e histidina (84).

A diferencia de las dehidrasas bacterianas que exhiben valores de pH óptimo alcalinos, las de mamíferos presentan valores en el rango 6,3 - 7,1 y requieren Zn^{2+} para su máxima actividad catalítica (85, 86). Al respecto, las ALA-D de eucariotes han sido consideradas como zinc-enzimas (86), a diferencia de las de procariotes.

Jaffe y col. (87) informaron que cuatro átomos de Zn^{2+} por octámero son requeridos para alcanzar una máxima activación de la apo-ALA-D de hígado bovino, por lo tanto los cuatro átomos adicionales del metal que pueden unirse a la enzima no

serían catalíticamente importantes.

Hasnain y col. (88), mediante estudios de espectroscopía de rayos X de ALA-D eritrocitaria humana, establecieron que cada átomo de Zn^{2+} está coordinado a tres átomos de azufre y a un cuarto átomo que sugieren podría ser oxígeno o nitrógeno. De este modo le asignarían al metal un rol estructural antes que catalítico.

El mecanismo de acción parece ser similar para las enzimas de diferentes fuentes. Los estudios de Nandi y Shemin (83) demostraron la formación de una base de Schiff entre un residuo lisina de la enzima y un grupo carbonilo de una de las moléculas de ALA, generando un carbanión estable que participa en una condensación aldólica con la segunda molécula de ALA, eliminándose una molécula de agua. Demostraron además que la primera molécula de ALA que se une a la enzima es la que da origen al grupo propiónico del PBG, incorporando su nitrógeno al anillo pirrólico; la otra molécula de ALA, fuente de la cadena acética del PBG, está unida a la enzima no covalentemente y retiene su grupo amino libre (89).

Estudios con atrapantes de bases de Schiff y de equilibrio de unión entre ^{13}C -ALA y la holoenzima bovina o la apoenzima con y sin grupos sulfhidrilos modificados permitieron concluir que la enzima posee cuatro sitios activos por octámero, no siendo necesarios grupos sulfhidrilos reducidos ni Zn^{2+} para que se forme la base de Schiff (90, 91).

La enzima tiene un alto grado de especificidad por su sustrato y las proteínas purificadas de hígado de mamíferos exhiben valores de K_m aparente de aproximadamente 4×10^{-4} M para ALA (67, 73, 85). Su vida media en hígado de ratón ha sido estimada en aproximadamente 5-6 días (92).

En la mayoría de los tejidos mamíferos la actividad de la ALA-D presenta un nivel 100 veces mayor que el de la ALA-S. De hecho, es probablemente la enzima cuya concentración está en mayor exceso comparada con las otras del camino biosintético

del hemo. Se observó una marcada inhibición de su actividad por el Pb^{2+} (93) y análogos de sustrato como la succinilacetona (94).

Los niveles de actividad de la ALA-D eritrocitaria en la población humana normal exhiben un rango de variabilidad interindividual de aproximadamente 3 a 4 veces, siendo el control genético de esta enzima compatible con una herencia autosomal codominante (95).

La actividad de la ALA-D muestra marcados cambios durante el desarrollo animal. Es extremadamente alta en hígado de feto de ratón (92, 96) y de cobayo (97), decrece rápidamente durante el período prenatal, exhibiendo el valor más bajo en el momento del nacimiento y alcanzando el del adulto, durante el primer mes de vida (92). También en células eritroides cambia durante el proceso de maduración aumentando tempranamente durante la diferenciación celular y precediendo la aparición de Hb, para disminuir con la maduración del reticulocito. Así, los reticulocitos de ratón exhiben 10 a 20 veces mayor actividad que la que presentan los eritocitos (98).

El gen estructural de la ALA-D está localizado en el cromosoma 9 (99, 100).

Se han clonado y secuenciado los cDNAs de las ALA-D de hígado humano (101) y de rata (102), y a partir de sus secuencias se han determinado las estructuras primarias de las proteínas respectivas; ambas muestran un 88% de homología (103).

1.2.1.3 Biosíntesis de URO'geno III

El URO'geno III se sintetiza a partir de cuatro moléculas de PBG por la acción concertada de dos enzimas citoplasmáticas: la PBG-D y la URO'geno III-cosintetasa (URO-CoS).

La primera de ellas constituye el tema de esta tesis y será tratada en detalle en la sección I.3 por lo que sólo se

desarrollarán las características y mecanismos de acción de la segunda enzima.

La existencia de la URO-CoS [URO'geno III-isómerasa; hidroximetilbilano hidrolasa (ciclizante); EC 4.2.1.75] fue propuesta por Bogorad (104-106) quien demostró que tanto la URO-CoS como la PBG-D eran requeridas para la conversión del PBG en URO'geno III. Durante las tres décadas siguientes, la función precisa de ambas enzimas en el metabolismo y su caracterización fue objeto de amplias investigaciones y debates, particularmente en lo referente al mecanismo molecular, intermediarios involucrados en la formación del macrociclo y su potencial interacción en un complejo enzimático citosólico (107, 108 y referencias citadas).

Actualmente se reconoce que la PBG-D forma un intermediario tetrapirrólico lineal que en presencia de la URO-CoS se convierte en URO'geno III mediante un reordenamiento intramolecular del núcleo tetrapirrólico D y el cierre del anillo. En ausencia de la URO-CoS, el intermediario se cicla no enzimáticamente formando URO'geno I (108, 112).

La URO-CoS fue por primera vez separada de la PBG-D y parcialmente purificada en plantas superiores, a partir de germen de trigo (106) y en fuentes mamíferas a partir de eritocitos humanos (113).

Tanto en eritocitos humanos normales (113, 114) como en bazo de ratón (115) se ha encontrado un exceso de la cosintetasa respecto de la deaminasa, lo que asegura la síntesis del intermediario fisiológico. Aún en tejidos con actividad de URO-CoS menor que la presente en tejidos hematopoyéticos, tales como cerebro, músculo, corazón, riñón, hígado y pulmón de ratón, la actividad de PBG-D es mucho menor (116). La ardilla Sciurus niger es una especie que naturalmente tiene una baja actividad de URO-CoS y excreta grandes cantidades de uroporfirina I (URO I) en orina (117).

La purificación y caracterización de esta enzima se ha

visto dificultada por su manifiesta sensibilidad al calor, lo cual hace más difícil su aislamiento al estado puro y además por su número de recambio relativamente alto, que determina la presencia de cantidades muy pequeñas de la proteína, aún en extractos crudos (118). Además, la medición de la actividad enzimática presenta dificultades inherentes a los procedimientos utilizados y que se caracterizan en general por ser ensayos largos, tediosos, de poca exactitud y reproducibilidad.

Los primeros ensayos, indirectos, se basaban en la cuantificación del consumo de PBG y/o la relación de los productos URO'geno III/URO'geno I posterior a la separación de los mismos como porfirinas esterificadas (116, 119, 120). Posteriormente, la actividad de URO-CoS se pudo determinar directamente, usando el "preuroporfirinógeno" sintetizado enzimáticamente (121, 122) o mediante el uso de hidroximetilbilano (HMB) obtenido por síntesis química (112, 123). Recientemente, la introducción de métodos de cromatografía líquida de alta presión para la separación de isómeros de URO sin derivatización previa permitió el desarrollo de ensayos más rápidos (124).

La enzima de fuentes mamíferas tiene un pH óptimo en el rango 7,4-7,8 y valores de K_m entre 5-20 μM , siendo extremadamente sensible a la temperatura. Es estabilizada por reactivos tiólicos, activada por iones Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} e inhibida por varios metales pesados como Zn^{2+} , Cu^{2+} y Cd^{2+} (125, 126).

La enzima de germen de trigo exhibió un FM de 62.000 y un pI de 6,1 a 6,7 (127) mientras que la purificada de hígado de rata mostró un valor de 42.000. Sin embargo, corridas electroforéticas de esta última enzima, en condiciones no desnaturizantes, mostraron dos bandas con actividad catalítica, lo que permitió sugerir la existencia de dos isoformas (128). Smythe y Williams (129) informaron, para la

enzima de la misma fuente, la presencia de dos formas interconvertibles de PM 36.000 y 20.000 obtenidas por tamizaje molecular, pero exhibiendo ambas un valor de 28.500 por SDS-PAGE.

La enzima de E. gracilis (123) purificada a homogeneidad mostró PM diferentes: 38.500 por tamizaje molecular y 31.000 por SDS-PAGE, concluyéndose que se trata de una proteína monomérica asimétrica.

Tsai y col. (126) y Jordan y col. (130) utilizando las mismas técnicas informaron PM idénticos para la enzima de eritrocitos humanos y de E. coli (29.500-30.000).

Kohashi y col. (128) presentaron evidencias de la existencia de un cofactor que podría ser disociado de la enzima de hígado purificada, sugiriendo que el mismo es un pteroil poliglutamato reducido y que aún en ausencia de URO-CoS, el cofactor podía sintetizar URO'geno III a partir de PBG y en presencia de PBG-D. Sin embargo, en trabajos más recientes realizados con enzimas de E. gracilis (123), E. coli (130) e hígado de rata (129) no se pudo detectar la presencia del mencionado cofactor.

La transformación eficiente del HMB generado por la PBG-D a URO'geno III por la URO-CoS ha llevado a sugerir que ambas enzimas podrían estar físicamente adyacentes (126), de hecho varios investigadores han sugerido que conforman un complejo proteico (114, 120 y 127).

Tsai y col. (131) han clonado y secuenciado el cDNA de la enzima de eritrocitos humanos, coincidiendo la secuencia de aminoácidos deducida a partir del mismo, con la obtenida de la enzima purificada. La enzima purificada a homogeneidad de una recombinante de E. coli K12, sobreproductora de la proteína, evidenció propiedades similares a las de la enzima humana; sin embargo, la comparación de la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas mostró baja homología (132).

I.2.1.4 Biosíntesis de COPRO'geno III

El primer tetrapirrol funcional con ocho cadenas laterales carboxílicas, URO'geno III, descarboxila secuencialmente sus cuatro cadenas laterales acéticas por acción de la URO'geno descarboxilasa [(URO-D);porfirinógeno carboxiliasa; EC 4.1.1.37].

Los cuatro isómeros de URO'geno, así como otros sintéticos que posean sustituyentes acetatos son sustratos de la enzima formándose los intermediarios con menor número de carboxilos (133-135).

La descarboxilación enzimática de los URO'genos I y III fue estudiada en preparaciones crudas de Chlorella (136), reticulocitos de conejo (133), Rp. spheroides (137) y eritrocitos de ave (138).

Los productos medidos: heptacarboxiporfirina, coproporfirina y pequeñas cantidades de penta- y hexacarboxiporfirina sugirieron que la descarboxilación del URO'geno sería un proceso que ocurriría en etapas. Battle y Grinstein (139), y San Martín de Viale y Grinstein (140) lo confirmaron demostrando que el heptacarboxiporfirinógeno III y, el hexacarboxiporfirinógeno III y pentacarboxiporfirinógeno III respectivamente, son intermediarios naturales del camino biosintético del hemo.

Los estudios cinéticos realizados con enzimas parcialmente purificadas de diferentes fuentes han sugerido que la reacción ocurre en dos etapas, una inicial y rápida que involucra la eliminación del primer carboxilo conduciendo a la formación de heptacarboxiporfirinógeno III seguida de una más lenta que comprende la remoción de los restantes residuos carboxilos de los acetatos, paso a paso, hasta COPRO'geno III. A través de estas investigaciones se postuló la existencia de una única proteína catalítica con más de un sitio activo (141-143).

Los isómeros de la serie III muestran una mayor velocidad

de transformación que sus correspondientes de la serie isomérica I (134, 135).

El mecanismo de acción de la URO-D para el URO'geno III fue demostrado por Jackson y col. (144). El mismo comprende la eliminación secuencial de los carboxilos de cada anillo pirrólico, comenzando por el D y prosiguiendo luego según el sentido de las agujas del reloj. Para el URO'geno I el mecanismo de descarboxilación si bien es secuencial no parece seguir una ruta específica sino que es al azar (145).

De Verneuil y col. (146) propusieron para eritrocitos humanos, la existencia de una sola proteína catalítica con cuatro sitios activos, ocurriendo en cada uno de ellos la descarboxilación de porfirinógenos (I o III) con distinto número de carboxilos.

La enzima eritrocitaria humana purificada a homogeneidad (147) mostró ser un monómero de 46 kDa y pI 4,6. Su Km para URO'geno III es 0,35 μM y para pentacarboxiporfirinógeno III 0,05 μM postulándose que contendría al menos dos sitios activos. Su actividad, al igual que ocurre con la enzima de otras fuentes, se inhibe por Cu^{2+} , Hg^{2+} y Pt^{2+} siendo sensible a la modificación de residuos sulfhidrilos y se sugiere que al menos uno de ellos estaría involucrado en el proceso catalítico.

Straka y Kushner (148) purificaron a homogeneidad y caracterizaron la enzima proveniente de hígado humano. Es una proteína monomérica de PM 57.000 y pI 4,6. Su actividad se inhibió por iones divalentes. Estos investigadores sugirieron la presencia de dos sitios activos no interactuantes y una acumulación diferencial de intermediarios dependiente de la relación URO'geno III/enzima.

Según Kawanishi y col. (149) la enzima proveniente de eritrocitos de ave, purificada a homogeneidad, es una proteína de PM 39.700 obtenido por SDS-PAGE y 79.000 por tamizaje molecular por lo que sugirieron que se trata de un dímero.

Comprobaron también la inhibición de la actividad enzimática por bifenilos policlorados.

Recientemente Elder y col. (150), utilizando técnicas inmunológicas, demostraron que la actividad de URO-D en eritrocitos humanos reside en una sola proteína. Su comparación con la de hígado humano evidenció que ambas proteínas son muy similares inmunológicamente, pero no idénticas, pudiéndose atribuir las diferencias halladas a modificaciones post-traduccionales debidas a proteólisis u oxidación de grupos tioles.

Romeo y col. (151, 152) clonaron varios cDNAs a partir del mRNAs de URO-D aislado de bazo de rata, los que fueron usados como sondas para aislar cDNA humano obtenido de mRNA de URO-D aislado de bazo humano. Se dedujo la estructura primaria de la proteína de rata y de la humana hallándose entre las mismas una alta homología (153).

El gen humano de la URO-D se halla presente en una única copia, localizado en el cromosoma 1 en la banda p34 (154,155). El análisis de la expresión de este gen evidenció que los mRNAs de diferentes tipos celulares son idénticos y que su acumulación producida durante la diferenciación eritropoyética se debería a una activación transcripcional del gen tejido-específica (152).

I.2.1.5 Biosíntesis de PROTO'geno IX

La formación del PROTO'geno IX a partir de COPRO'geno III, que atraviesa la membrana mitocondrial externa, involucra la descarboxilación oxidativa de dos de las cadenas laterales de ácidos propiónicos en las posiciones 2 y 4 de los anillos A y B para dar dos grupos vinilos. Esta reacción está catalizada por la enzima COPRO'geno oxidasa [(CPG-OX); COPRO'geno descarboxilasa oxidativa; EC 1.3.3.3].

La enzima ha sido purificada parcialmente a homogeneidad a

partir de hígado bovino (156, 157), de rata (158) y ratón (159).

En mamíferos es una enzima mitocondrial que puede ser fácilmente solubilizada sin el uso de detergentes, no encontrándose unida a membranas (158). Elder y Evans (160) demostraron que se halla localizada en el espacio intermembrana de la mitocondria de hígado de rata, sugiriendo la existencia de una unión débil con alguna de las superficies de la membrana que limitan este espacio. Estos resultados son consistentes con las observaciones de Grandchamp y col. (161) referentes a que una fracción de la actividad enzimática (24%) aparece asociada con el complejo membrana interna - matriz mitocondrial, sugiriendo una unión iónica débil con la cara externa de la membrana interna.

La reacción catalizada por la CPG-OX requiere la presencia de oxígeno, que actuaría como oxidante en la reacción y puede usar isómeros de COPRO'geno tipo III y IV, no actuando sobre los de tipo I o II (156, 158, 162).

Los organismos que crecen en condiciones anaeróbicas estrictas utilizan otro sistema aceptor de electrones distinto del oxígeno, probablemente S-adenosil metionionina (163, 164).

Para la enzima nativa de hígado de rata y bovino se determinaron PM de 80.000 y 71.600 respectivamente. Se comprobó que la enzima bovina es monomérica. En ambos casos no mostraron requerimientos de cofactores o grupos prostéticos, siendo la enzima bovina activada por fosfolípidos y detergentes no iónicos (157, 158).

La enzima de levadura, localizada en el citosol de la célula demostró ser un homodímero de 70 kDa y contener dos átomos de hierro por mol de enzima nativa. Se inhibe por reactivos tiólicos, se activa por fosfolípidos y utiliza oxígeno como aceptor (165).

La CPG-OX purificada de hígado de ratón tiene una masa molecular mínima de 35.000, confirmada por caracterización

inmunológica, mientras que la proteína nativa parece ser un dímero de 70 kDa. Estas características la asemejan mucho más a la enzima de levadura aunque ambas difieren en su composición aminoacídica (159, 165).

El mecanismo de la reacción que conduce a la formación de PROTO'geno IX implica una descarboxilación que ocurre sólomente a través de la pérdida estereoespecífica de uno de los átomos de hidrógeno β de la cadena propiónica (166).

Yoshinaga y Sano (167) mediante la utilización de sustratos sintéticos sugirieron la formación de los grupos vinilos a partir de intermediarios β -hidroxipropionatos, ocurriendo la transformación de la cadena lateral de la posición 2 más rápidamente que la de la posición 4. Este mecanismo secuencial corroboró los resultados inicialmente obtenidos por Sano y Granick (156) quienes informaron por primera vez la presencia de un intermedirio tripropionatomonovinilporfirinógeno, que posteriormente se aisló de la glándula de Harder de rata (168, 169), identificado como 2-vinil-4-propionato-deuteroporfirina IX y denominado harderoporfirina IX (169). Utilizando harderoporfirinógeno e isoharderoporfirinógeno sintetizados químicamente y diferentes fuentes enzimáticas, diversos investigadores confirmaron que el ácido propiónico de la posición 2 se convierte en vinilo antes que el de la posición 4 (170-172).

Para la enzima hepática bovina se sugirió que al menos un residuo tirosina estaría involucrado en el sitio activo, participando presumiblemente en la reacción inicial de oxidación (157).

La localización del gen humano de esta enzima se ha establecido en el cromosoma 9 (173).

I.2.1.6 Biosíntesis de PROTO IX

El PROTO'geno IX se oxida a PROTO IX perdiendo seis átomos

de hidrógeno por acción de la PROTO'geno IX oxidasa [(PBG-OX); PROTO'geno IX:oxígeno oxidoreductasa; EC 1.3.3.4], oxidación que también puede ocurrir no enzimáticamente a velocidad apreciable.

Esta actividad enzimática fue inicialmente sugerida por las experiencias de Sano y Granick (156) y posteriormente identificada en levadura (174), hígado de rata (175) y fibroblastos, linfocitos y leucocitos humanos (176-178) siendo atribuida a una proteína mitocondrial.

El grupo de Jackson (179, 180) demostró que el proceso llevado a cabo por la enzima es estereoespecífico, teniendo lugar de un solo lado del anillo tetrapirrólico. Se ha sugerido además, que de los cuatro hidrógenos en posiciones meso que se eliminan durante la reacción, tres de ellos lo harían como hidruros y el restante como protón (181).

La enzima tanto de levadura como de mamíferos es dependiente de oxígeno molecular (174, 175, 182) y tiene una gran especificidad de sustrato (182).

En condiciones de anaerobiosis, Jacobs y Jacobs (184) describieron para procariotes otros compuestos que pueden funcionar como aceptores alternativos de electrones tales como fumarato o nitrato. En estos casos las reacciones de óxido-reducción están acopladas a través de intermediarios de la cadena de transporte de electrones (185).

Klemm y Barton (186) postularon que en Desulfovibrio gigas, un anaerobio estricto, la enzima tendría actividad de deshidrogenasa en lugar de oxidasa.

En levaduras la enzima se sintetiza en mitocondrias a diferencia de lo que ocurre en mamíferos donde se demostró que su síntesis no ocurre en esas organelas (187, 188).

En mamíferos la enzima está localizada en la membrana interna mitocondrial anclada en la bicapa lipídica, teniendo el sustrato igual acceso al sitio activo desde ambos lados de la membrana (189).

Se ha informado una variedad de PM para las enzimas de diferentes fuentes, determinándose valores de 35, 32, 57 y 68 kDa para las hepáticas de rata (175), humana (190), bovina (191) y de ratón (192) respectivamente; mientras que en organismos inferiores, valores de 180 y 148 kDa se informaron para la de S. cerevisiae (174) y la de Desulfovibrio gigas (193), sugiriéndose en este último caso, la presencia de subunidades de distintos tamaños.

La enzima hepática humana medida en mitocondrias homogeneizadas y en presencia de detergente reveló una actividad específica de 8,3 nmoles de PROTO IX/h.mg de proteínas y una inhibición por sustrato a partir de 20 μ M. Además, algunas metaloporfirinas produjeron efectos inhibitorios (190).

La PPG-OX de mitocondria hepática de ratón purificada a homogeneidad es una proteína monomérica de 65 kDa que no presenta evidencias de poseer un cofactor cromofórico, ni activarse o inhibirse por cationes divalentes o reactivos sulfhidrúlicos (192).

Siepker y col. (191) informaron, para la enzima de hígado bovino purificada a homogeneidad, la presencia de un cromóforo fuertemente unido a la misma que identificaron como FAD, sugiriendo que ello explicaría cómo ocurre la transferencia de electrones al oxígeno molecular durante la oxidación. Además informaron la existencia de epitopes comunes entre la PPG-OX y la ferroquelatasa proponiendo la existencia de un gen ancestral común para ambas enzimas.

1.2.1.7 Biosíntesis de protohemo

La inserción de Fe^{2+} en la PROTO IX, catalizada por la ferroquelatasa [(Fq);hemo sintetasa; protohemo ferroliasa; EC 4.99.1.1], lleva a la síntesis de protohemo con liberación de dos protones. Aunque esta reacción puede ocurrir en ausencia de

la enzima (194, 195), la actividad de la misma ha sido identificada en múltiples especies y tejidos de organismos procariotes y eucariotes (192-203).

La enzima está asociada a la membrana plasmática en procariotes (202, 204) y a la membrana interna mitocondrial en eucariotes (205, 206). Ha sido ampliamente estudiada en cuanto a su mecanismo cinético, su inhibición por N-alquilporfirinas y su especificidad por el sustrato ión metálico y la porfirina, siendo para ello purificada a homogeneidad a partir de varias fuentes (204, 207-212).

Porfirinas dicarboxílicas como deuteroporfirina y mesoporfirina pueden actuar como sustratos de la enzima "in vitro" (208-210, 213) y metales como Co^{2+} y Zn^{2+} pueden ser incorporados eficientemente por la misma (205, 212). Tephly y col. (214) y De Matteis y col. (215) informaron que productos de la metabolización de ciertas drogas actuaban como inhibidores de la enzima "in vitro". Estos fueron identificados como N-metilprotoporfirina, comprobándose que el compuesto inhibía competitivamente, respecto de la porfirina, a la enzima hepática bovina (216).

Dailey y Fleming (210) propusieron para la Fq de hígado bovino un mecanismo cinético secuencial Bi-Bi en el que la unión del Fe^{2+} ocurriría antes que la de la porfirina, y la liberación del producto hemo sería anterior a la de los protones. Camadro y col. (212) propusieron para la enzima de hígado humano un mecanismo Bi-Bi al azar.

Varios investigadores han propuesto que grupos sulfhidrilos son esenciales para la actividad catalítica (207, 217). Se postuló que el Fe^{2+} se uniría al sitio activo de la enzima bovina a través de dos grupos sulfhidrilos vecinales y que la presencia de al menos una arginina en el mismo jugaría un rol importante en la orientación apropiada de la porfirina en el sitio activo catalítico de la Fq (218, 219).

Se ha propuesto un modelo molecular para el sitio activo de

la enzima hepática bovina, describiéndolo como un "bolsillo"hidrofóbico parecido al que se encuentra en las globinas y citocromos (219, 220).

Todas las Fq purificadas de vertebrados exhibieron PM cercanos a 40.000. Taketani y Tokunaga (207, 209) informaron para las enzimas nativas de hígado de rata y bovino valores de PM cercanos a 200.000 y a 40.000 por SDS-PAGE. Si bien ello sugeriría la naturaleza oligomérica de la Fq, esta discrepancia podría explicarse por la tendencia de la enzima a formar agregados (221).

La enzima de hígado bovino ha sido localizada en la membrana interna de la mitocondria, siendo descripta como una proteína intrínseca con su sitio activo orientado hacia la matriz mitocondrial (222). La actividad de la proteína solubilizada es influenciada en mayor o menor grado por la presencia de lípidos o ácidos grasos (207, 210, 211, 223).

Los estudios realizados sobre la síntesis de la Fq de S. cerevisiae (212) y de ratón (224) "in vitro" e "in vivo" indicaron en ambos casos que al igual que otras proteínas mitocondriales se sintetiza en citoplasma como un precursor de mayor PM siendo luego transferida y procesada para convertirse en la proteína madura.

I.2.2 REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO

La capacidad de las células mamíferas para sintetizar y utilizar hemo es fundamental para la vida y se avanza continuamente en el conocimiento de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de sus concentraciones finamente controladas en los diferentes compartimientos subcelulares.

La expresión cuantitativa y la regulación de su producción en animales superiores difiere en los distintos tejidos. En estos aspectos, el tejido hepático y el eritroide han sido los más investigados debido a que producen la mayor parte del hemo

requerido por el organismo. Normalmente, el hígado humano adulto sintetiza alrededor del 15% del hemo corporal total (225) siendo destinado en mayor proporción a la formación de citocromo P-450 y minoritariamente a otras hemoproteínas esenciales como citocromos, catalasa, peroxidasa, etc. El hemo restante es sintetizado en las células eritoides de médula ósea, respondiendo de ese modo a la necesidad de síntesis de Hb que requiere el organismo.

I.2.2.1 Regulación en células hepáticas

La velocidad de síntesis del hemo en el hígado está primariamente controlada por la actividad de la ALA-S, primera enzima de la vía, que ha sido identificada como la de velocidad limitante (226-228). Su vida media es extremadamente corta y el Km para uno de sus sustratos, la glicina, se halla en el orden de 5-19 mM (229). Así, ambas características, el tiempo de recambio y la disponibilidad de sustrato contribuirían a su identificación como enzima limitante de un camino caracterizado por reacciones termodinámicamente favorecidas en la dirección de síntesis y la casi no existencia de rutas alternativas para la metabolización de los intermediarios. Su localización es mitocondrial, así como lo son el sustrato succinil-CoA y la formación del producto final, hemo.

Se acepta que el hemo, mediante mecanismos de retroalimentación negativa, actúa sobre la ALA-S, autorregulando su propia síntesis en el hígado de aves (227, 228) y de mamíferos adultos (226, 230).

El trabajo pionero de Granick (227) demostró que la ALA-S hepática de embriones de pollo se induce por una serie de drogas porfirinogénicas y que este efecto puede prevenirse por la administración simultánea del producto final de la vía: protohemo. Así, se postuló que el hemo reprimía la transcripción y que las drogas competían directamente por una

proteína (aporrresora) que controlaría la síntesis a nivel génico.

Investigaciones más detalladas sobre el mecanismo de inducción de tan variados agentes porfirinogénicos -que incluyen esteroides, numerosas drogas de uso terapéutico y compuestos químicos- se encaminaron a explorar una hipótesis alternativa: que estos actuaran indirectamente disminuyendo el nivel de hemo (225, 229). Srivastava y col. (231) demostraron que la inducción por drogas sería una consecuencia secundaria provocada por la disminución del nivel del hemo.

Actualmente, se asume la existencia de un "pool" intracelular de hemo libre regulatorio, el que sería alimentado tanto por fuentes exógenas como endógenas. Aunque han sido obtenidas evidencias indirectas de su existencia (228, 232-234), su identidad y localización precisa no han sido aún claramente definidas.

Las evidencias presentadas hasta ahora demostrarían que el mecanismo por el que el hemo ejerce su control sobre la ALA-S hepática involucra la represión de la síntesis de su mRNA y que drogas y xenobióticos que inducen a la enzima lo hacen estimulando la transcripción y aumentando la cantidad de su mensajero (235-238). Este último efecto sería el resultado de la potencialidad de los inductores para disminuir el "pool" hémico regulatorio por uno o más de los siguientes mecanismos (239): a) aumento de la destrucción del hemo, b) inhibición de pasos enzimáticos de la biosíntesis del hemo y c) incremento de la velocidad de combinación del hemo con apoproteínas para la síntesis o reconstitución de hemoproteínas. Aunque los tres mecanismos conducen a una estimulación de la síntesis de ALA-S, de variable intensidad, y también a cierta acumulación de los intermediarios del camino, sólo en el caso b) esa acumulación resulta particularmente remarcable para el intermediario que precede al bloqueo enzimático, como ocurre en las porfirias experimentales producidas por drogas como

hexaclorobenceno, griseofulvina, etc.

Otro camino por el cual el hemo controla la cantidad de ALA-S catalíticamente activa, resulta de su efecto inhibitorio sobre el transporte de la proteína sintetizada en el citosol hasta la mitocondria. Hayashi y col. (240) comprobaron que la administración de hemina a ratas tratadas con AIA causaba una acumulación en la fracción citosólica de ALA-S hepática proveniente del mensajero preexistente.

El estudio de la regulación por hemo de la síntesis de ALA-S a nivel traduccional ha arrojado resultados conflictivos. Whiting (241) observó que concentraciones de hemo hasta 10 μM no afectaban la síntesis de la enzima, en experimentos de elongación realizados con polisomas y la fracción sobrenadante post-mitocondrial de hígado de embrión de pollo. Yamamoto y col. (242) informaron que concentraciones mayores de 20 μM inhibían su síntesis a nivel del paso de elongación cuando se utilizaba un sistema heterólogo de polisomas de hígado de rata y lisado de reticulocitos de conejo. Sin embargo, experimentos similares realizados por otros investigadores (243) utilizando sistemas de traducción no homólogos, mostraron que el hemo no ejercía ningún efecto aún a concentraciones de 100 μM . A pesar de que se desconoce la razón de los resultados no concordantes, estos autores han sugerido que la utilización de sistemas heterólogos de traducción puede no reflejar la situación real que ocurre en la célula.

Por otra parte, no se ha estudiado el efecto del hemo a nivel de la etapa de iniciación de la traducción. El hemo no parece inhibir directamente la actividad de ALA-S cuando se estudió su efecto sobre la enzima purificada o de mitocondrias intactas proveniente de hígado de embrión de pollo (244, 245).

De este modo, el nivel de hemo intracelular "in situ", cuya concentración en hígado de rata en condiciones normales se supone del orden de 50-100 μM (246), es considerado como el mediador final de su propia síntesis a través de sus efectos

sobre la producción y el transporte de la ALA-S.

La concentración del "pool" regulador está determinada además por su utilización, destinada a mantener los niveles de hemoproteínas hepáticas mayoritarias y por la hemo oxigenasa, enzima de velocidad regulante de su catabolismo que se induce por su propio sustrato, el hemo. Badawy y col. (21, 247) demostraron que una hemoproteína minoritaria citosólica, la triptofano pirrolasa, puede ser utilizada como un marcador sumamente sensible a los cambios de concentración del hemo intracelular libre, en virtud de su grado variable de saturabilidad por el mismo. Esta proteína jugaría así, un rol importante en el control de su disponibilidad.

Este "pool" es también afectado por el hemo exógeno que ingresa al hepatocito y por el pasaje del endógeno desde su sitio de síntesis a otros compartimientos a través de la membrana mitocondrial y/o de otras organelas o de células blanco. Estos procesos de traslocación no constituyen un mecanismo de simple difusión sino uno más complejo, que requiere la participación de múltiples proteínas intra y extracelulares (246).

Cabe destacar que además de la ALA-S, otras enzimas ocupan un lugar destacable en el control de la biosíntesis del hemo. En pacientes con porfirias hepáticas inducibles se considera a la PBG-D como un segundo control de la vía biosintética del hemo, ya que en situaciones en las que la ALA-S está desreprimida, la actividad de la PBG-D pasa a ser la enzima de velocidad limitante. Así, tanto en PAI como en variegata y coproporfiria hepática, se acumulan los precursores ALA y PBG, reflejo del bloqueo y control que ejerce dicha enzima. Estas situaciones pueden controlarse y normalizarse mediante la administración del hemo, en forma de hematina (hidroxiferriprotoporfirina) constituyendo esta práctica una de las terapias que con mayor éxito se han aplicado para el tratamiento de este tipo de porfirias (248).

Otra enzima que ejercería un rol regulatorio a nivel de la síntesis del hemo hepático es la PBG-oxigenasa [(PBG-O); EC 4.2.1.24] que cataliza la oxidación del PBG a 2-hidroxi-5-oxo porfobilinógeno (249), metabolito que no se convierte en porfirina. Se ha encontrado que esta enzima se induce en hígado de rata por sustrato más fenobarbital, así como por esteroides (250, 251).

I.2.2.2 Regulación en células eritorides

En tejido eritroide, el control de la biosíntesis del hemo está menos definido, pero parece ser diferente al hepático. Una de las razones primarias que explicarían la diversidad señalada recaería en los diferentes requerimientos de hemo de ambos tejidos y la función diferente que éste cumple en los mismos. Otra estaría referida al hecho que en el hígado adulto la multiplicación o división celular ocurre mínimamente, mientras que en el tejido eritroide los eventos de diferenciación y proliferación, y los de maduración y síntesis de Hb en eritroblastos se suceden continuamente. Así, el hígado fetal de rata, que es primordialmente eritroide, exhibe una alta actividad de ALA-S no inducible y no reprimible por hemo (252). Otros trabajos han mostrado que las ALA-S hepática y eritoride exhiben diferente respuesta a la hipoxia, policitemia, eritropoyetina y drogas porfirinogénicas (253). Además, la actividad de la ALA-S no es limitante para la formación de Hb en células eritorides de hígado fetal de ratón (253)

En cultivos de médula ósea de rata tratados con eritropoyetina la actividad de PBG-D se incrementa hasta 3,5 veces, correlacionándose temporalmente con la síntesis del hemo. Este aumento se debe probablemente a la síntesis "de novo" de la proteína, mientras que los valores de actividad de ALA-S, DOVA-T, ALA-D y Fq no se afectan en forma significativa. Estudios "in vivo" en cultivos de médula ósea con niveles bajos

o altos de eritropoyetina exhiben actividades de PBG-D inferiores o superiores al valor normal respectivamente (254). Frydman y col. (255) informaron que en médula ósea de ratas hipóxicas, las actividades de PBG-D y PBG-O mostraron cambios temporales inversos, sugiriendo que la relación de ambas podría ser un punto de control de la biosíntesis del hemo en este tejido.

Los experimentos realizados con células eritroleucémicas de ratón transformadas con virus Friend han aportado datos significativos al estudio de la regulación de la síntesis del hemo durante la diferenciación eritroide (254). Cuando éstas células son inducidas a diferenciarse en presencia de dimetilsulfóxido, la concentración de hemo aumenta aproximadamente 50 veces. Este aumento es el resultado de una inducción secuencial de las enzimas del camino biosintético, siendo el aumento de la Fq coincidente con el de la formación de hemo. Estos resultados llevaron a Sassa y col. (254,256) a proponer a la Fq como la enzima de velocidad limitante en tejido eritroide. También se informó que durante la diferenciación de células normales de médula ósea humana tratadas con eritropoyetina, se aprecia un aumento temprano de la actividad de PBG-D (257). Estas evidencias permitieron sugerir que la inducción temprana de ciertas enzimas responde a la activación de un reloj biológico, tal como una serie de genes temporales programadores de la funcionalidad de genes estructurales durante la diferenciación celular (258).

Granick y Sassa (259) observaron que la adición de hemina a cultivos de células Friend incrementaba la síntesis del hemo incluyendo la actividad de ALA-S. Sin embargo Beaumont y col. (260) hallaron que en estas células inducidas con dimetilsulfóxido y tratadas con succinilacetona, la actividad de ALA-S se incrementaba notablemente, siendo este aumento prevenido por hemo. Se sugirió así, que la ALA-S eritroide estaría regulada por el hemo.

Resultados diferentes se informaron cuando se utilizaron reticulocitos de conejo (261-263) ya que en estos sistemas, el hemo inhibe primariamente la incorporación del hierro, provisto por la transferrina, al macrociclo. Por el contrario, este mecanismo no opera normalmente en células eritopoyéticas inmaduras de humanos, en las que la biosíntesis estaría sujeta a una regulación por retroalimentación negativa a nivel de la formación de ALA, no habiéndose establecido claramente el mecanismo y el punto de control (263).

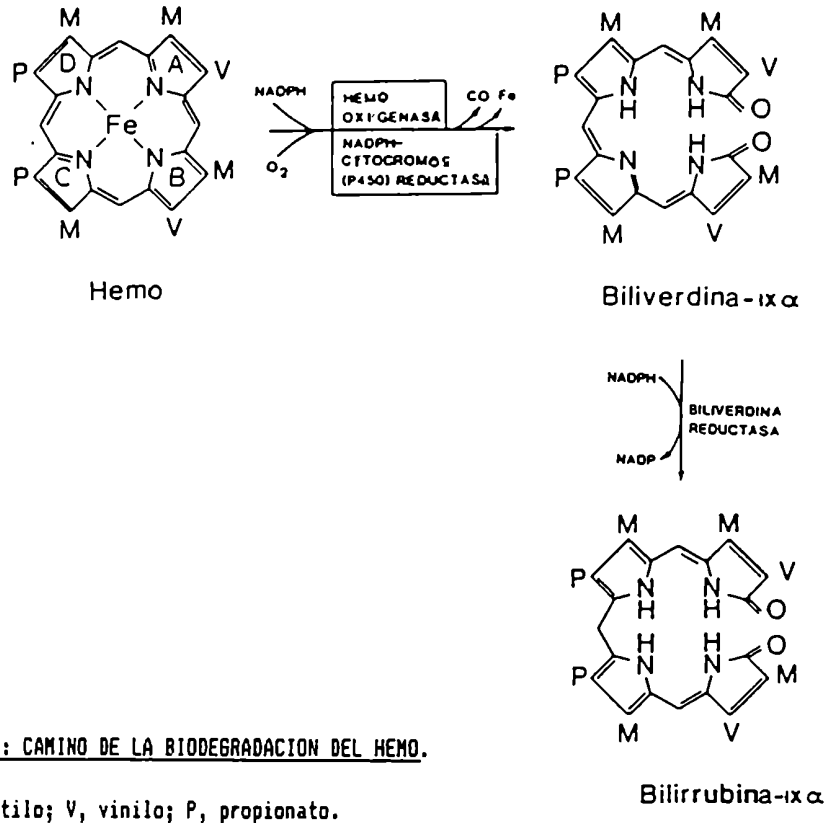
La actividad reducida de ALA-S observada en médula ósea de pacientes anémicos por deficiencia de hierro sugiere que la expresión de la enzima durante la diferenciación estaría relacionada o regulada por la disponibilidad de hierro (264).

1.2.3 BIODEGRADACION DEL HEMO

La ruta de degradación del hemo más importante en todas las células estudiadas involucra la pérdida del átomo de hierro, la eliminación del carbono que conforma el puente α metínico con fijación de un átomo de oxígeno y su liberación como monóxido de carbono; la incorporación de dos átomos adicionales de oxígeno en los anillos A y B del tetrapirrol y generación de una estructura bilénica denominada biliverdina IX α (265, 266) (Fig.5).

Este bilatrieno se reduce química o enzimáticamente en el puente metínico central, utilizando agentes reductores como donores de los electrones involucrados en el proceso. El biladieno fisiológico así formado constituye el pigmento lipofílico conocido como bilirrubina IX α , sus dos grupos propionatos son esterificados por una glucuronil transferasa hepática microsomal para dar mono- y di-glucoronidos de bilirrubina solubles. Este proceso utiliza UDP-glucuronato como co-sustrato. Esta conjugación permite su secreción a la bilis y su eliminación casi cuantitativa como compuestos

tetrapirrólicos más reducidos denominados genericamente pigmentos biliares (267).



En humanos, el hemo proveniente de la hemoglobina de eritrocitos senescentes es la fuente más importante de bilirrubina y es responsable del 75 al 85% de su producción diaria. Aparte del eritrón todas las células contienen cantidades variadas de hemoproteínas, muchas de las cuales recambian tan lentamente o están presentes en tan pequeñas cantidades que su contribución a la producción de bilirrubina

es despreciable. La notable excepción involucra a hemoproteínas (particularmente tipo b) intrínsecas del hígado, que son responsables del 20% restante. De todas las hemoproteínas presentes el cit P-450 es el principal contribuyente, hecho que refleja su alta concentración en este tejido y su vida media relativamente corta. Aproximadamente, el 70% del hemo total sintetizado en el hígado es usado para generar cit P-450 (267).

1.2.3.1 Biodegradación a biliverdina

La oxidación acoplada del hemo y un agente reductor, por el oxígeno, puede ocurrir por catálisis enzimática o química. En el primer caso, el clivaje regio-selectivo en el borde más lipofílico del macrociclo, la extensión del C meso α y su oxidación con pérdida del metal son llevadas a cabo por el sistema microsomal hemo oxigenasa [(HO)hemo:NADPH:oxígeno oxidoreductasa; EC 1.14.99.3] (265, 266, 268). Todas estas transformaciones dan como producto específico el isómero de la biliverdina, un tetrapirrol abierto de conformación helicoidal. En el segundo, se obtienen los cuatro isómeros posibles de bilirrubina (α , β , γ , y δ) indicando un ataque oxidativo al azar, de los cuatro puentes meso del macrociclo (269). Por otra parte, el hemo puede ser degradado por especies activas de oxígeno, a otros pigmentos no bilénicos. Sin embargo, la HO es el sistema degradante más eficiente. La mayor actividad se encuentra en el bazo y es alta en órganos ricos en células del retículo endotelial.

La enzima está presente en hígado, riñón y otros tejidos en niveles muy bajos pero puede elevarse por acción de diversos inductores (270).

La HO ha sido aislada y posteriormente purificada hasta aparente homogeneidad de hígado de rata (271, 272) de bazo de cerdo y bovino (273, 274) y de testículo de rata (275). En todos los casos evidencia ser una proteína monomérica,

localizada en fracción del retículo endoplasmático liso y de aproximadamente 32.000 Da. A partir del cDNA clonado de bazo (276) se dedujo la estructura primaria de la enzima de rata, estando constituida por 289 aminoácidos. Recientemente, se demostró que la proteína humana contiene 288 aminoácidos (277). Ambas proteínas exhiben un segmento rico en aminoácidos hidrofóbicos cercanos a su carboxilo terminal, secuencia que permite su integración en las membranas del retículo endoplasmático, siendo este mecanismo post-traducciona l y de inserción espontánea (278).

Con técnicas más refinadas, el grupo de Maines (279 y referencias citadas) logró demostrar la existencia de dos isoformas de HO en hígado, testículo, bazo y cerebro de rata, las que diferían en PM, movilidad electroforética, sensibilidad a la temperatura, Km, antigenicidad y respuesta a inductores. Estos hallazgos le permitieron proponer que estas formas, HO-1 y HO-2, son isoenzimas que representan los productos de transcripción de dos genes diferentes, siendo la expresión de los mismos independiente de la fuente del tejido. La abundancia relativa de las dos isoformas difiere en los distintos tejidos. En condiciones normales, la HO-2 constituye la forma predominante de la proteína en el hígado (2:1), es más sensible al calor y no se ve afectada por inductores; mientras que la HO-1 es sensible a múltiples efectores, entre ellos su propio sustrato que la induce significativamente, es catalíticamente más reactiva y no contiene cisteína (279).

La acción de la HO, localizada mayoritariamente en la membrana del retículo endoplásmico liso, requiere NADPH, oxígeno molecular, la actividad concertada de la NADPH-citocromo P-450 reductasa microsomal, así como la presencia de un átomo de hierro central en la metaloporfirina para que ésta se comporte como un sustrato efectivo (270). El hemo libre o sus complejos en los cuales se encuentra débilmente unido a apoproteínas son los sustratos preferidos,

mientras que si la unión es fuerte, su capacidad de comportarse como tal es nula o se ve muy restringida (267, 270, 279). Las protoporfirinas queladas con átomos de Sn, Co, Zn o Mn actúan como inhibidores competitivos (274).

Tomaro y col. (280) estudiaron lo requerimientos estructurales de los sustratos, utilizando un amplio espectro de hemos sintéticos con modificaciones en las cadenas β de los pirroles. Demostraron que la especificidad de sustrato está restringida a hemos que posean dos cadenas propionatos vecinales en las posiciones 6 y 7 correspondiéndose con el lado hidrofílico del macrociclo, mientras que los sustituyentes en los pirroles A y B jugarían un rol menor.

Por analogía de la unión del protohemo en las hemoproteínas, ubicándose en zonas selectivas o "bolsillos" de las apoproteínas, es probable que el hemo en su interacción con la HO se vea orientado de manera que el puente metino α se sitúe dentro del sitio activo, con los anillos C y D y sus cadenas hidrofílicas de los propionatos expuestas hacia el medio hidrofílico, favoreciendo así el clivaje regio-selectivo. La HO localizada en la membrana microsomal forma con su sustrato una hemoproteína transiente que interacciona con una flavoproteína NADPH-cit P-450 reductasa intrínseca y acepta los equivalentes de reducción del NADPH para asegurar el estado reducido esencial del sustrato (Fe^{2+}) y para la activación intramolecular del O_2 que permita el ataque sobre la posición α (281, 282). Este proceso parece involucrar la formación de al menos tres intermediarios con tres etapas diferenciales no muy bien conocidas (Fig.6). El producto de la primera reacción oxidativa sería el α hidroxihemo (α oxihemo). Las secuencias químicas desde este intermediario hasta la biliverdina no están suficientemente aclaradas, pero se sugiere que seguiría la conversión oxidativa del hidroxihemo a un intermediario no bien caracterizado que presenta una absorción máxima a 688 nm, con liberación del C

meso α de la porfirina como CO. Finalmente, la oxidación de esta sustancia a un complejo Fe-biliverdina que espontáneamente se convierte en biliverdina IX α por liberación del hierro (281, 282). Itano e Hirota (283) han sugerido que la sustancia intermedia es verdohemo.

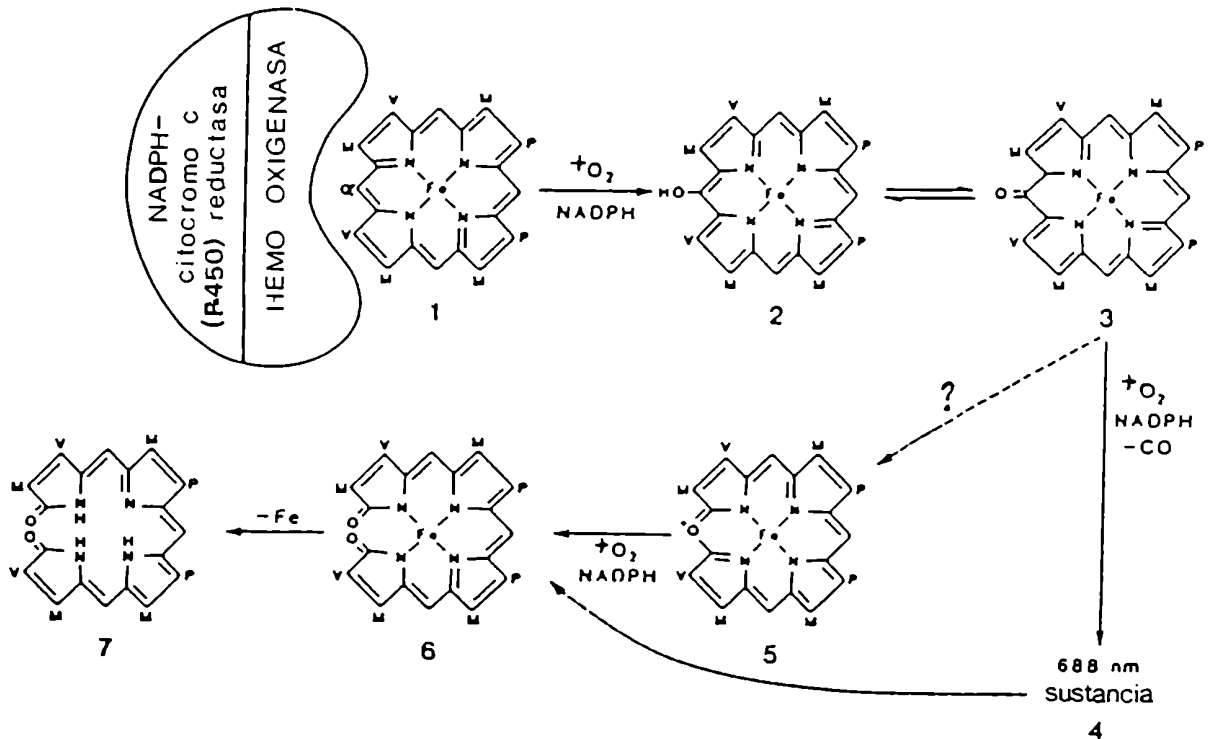


FIG.6: SECUENCIA POSTULADA PARA EL MECANISMO DE REACCIÓN DE LA HEMO OXIGENASA.

1. hemo; 2. α -hidroxi hemo; 3. α -oxi hemo; 4. sustancia 688 nm (estructura desconocida); 5. verdohemo; 6. complejo hierro-biliverdina; 7. biliverdina; M, metilo; V, vinilo; P, propionato.

Como lo ha señalado Kikuchi y Yoshida (281) el proceso como un todo, comprende una serie de oxidaciones autocatalíticas con

intervención de una única enzima, la HO, con intermediarios de reacción que actúan como cofactores.

Es interesante destacar que se ha caracterizado un sistema degradativo del hemo, localizado en la membrana interna de las mitocondrias, asociado con el complejo I respiratorio, la NADH-ubiquinona oxidoreductasa para la transferencia de electrones (284).

I.2.3.2 Biodegradación a bilirrubina

Mientras que en pájaros, reptiles y anfibios la biliverdina no sufre una degradación posterior y se excreta como tal, en mamíferos se reduce y se conjuga para ser secretada a la bilis como bilirrubina conjugada (282).

La transformación del bilatrieno, biliverdina IX α , a un biladieno, bilirrubina IX α , es llevada a cabo por una enzima citosólica presente en exceso, la biliverdina reductasa [bilirrubina NAD(F)⁺ oxidoreductasa; EC 1.3.1.24] (268, 285). La reducción del puente metilénico central del tetrapirrol puede ser catalizada también por diversos agentes químicos (286).

La enzima exhibe dos pH óptimos distintivos a valores 7,0 y 8,7 con preferencia también selectiva por su cofactor dador de electrones, NADH a pH 7,0 y NADPH a pH 8,2 (279). Su especificidad de sustrato es amplia, sólo restringida a la presencia de al menos dos residuos propiónicos que pueden o no ser vecinales (286). Es inhibida por su producto y sensible a reactivos sulfhidrúlicos. La proteína ha sido aislada y purificada de diversos tejidos animales (282) y purificada a homogeneidad de hígado de rata (285). Puede ser obtenida en dos formas moleculares que difieren en sus cinéticas, PM, presencia de residuos cisteína, etc. Una de ellas, forma 1, de PM 35.000 y que contiene 3 residuos de cisteína, exhibe una alta velocidad de reducción para el sustrato fisiológico (isómero α)

y una baja velocidad para la bilirrubina IX β (Apertura en C meso β); mientras que la forma 2, presenta velocidades de reducción similares para ambos isómeros (287). Bajo condiciones de estres oxidativo y por ende, degradación de hemo inducida, la biliverdina reductasa hepática cambia sus modelos de formas moleculares. La forma 1 desaparece y se origina una nueva forma 3 con PM diferente, aún al de la forma 2, que reduce ambos isómeros con igual velocidad (288). La conversión de la forma molecular 1 a la 3 está mediada por un proceso que requiere síntesis proteica y nucleotídica. Se induce una deshidrogenasa peroxisomal dependiente de NAD^+ que oxida la forma 1 a la 3, dimerizándola, mediante una unión disulfuro intercatenaria de la forma 1. "In vivo", esta conversión es un proceso rápido (288).

La especificidad de la biliverdina reductasa es mucho menor que la de la HO, aunque sólo reduce bilatrienos que poseen 2 residuos hidrofílicos (286). La existencia de estas tres formas moleculares que poseen capacidad de reducir diferentes isómeros de biliverdina permitiría la transformación no sólo de los productos enzimáticos fisiológicos sino también los generados por oxidaciones químicas no específicas de hemoproteínas que ocurren "in vivo".

La bilirrubina es un producto de deshecho y tóxico si se elevan sus niveles fisiológicos, especialmente en neonatos. La exposición a luz fluorescente azul o blanca del recién nacido icterico, es la terapéutica convencional por excelencia. El fundamento de este tratamiento está basado en la fotorreacción que sufre la bilirrubina y que involucra probablemente una isomerización configuracional y estructural de la misma, por disrupción de uniones hidrógeno intramoleculares. No se descarta además, que ocurran oxidaciones a mono y dipirroles; en ambos casos se originan productos que son suficientemente polares para ser excretados (289).

Otro tratamiento más reciente es la utilización de

metaloporfirinas no férricas (i.e. Sn-protoporfirina) que actuando como análogos de sustrato de la HO intentan modularla para suprimir estados de hiperbilirrubinemia en humanos.

El grupo de Kappas (290) ha estudiado en detalle la capacidad de la Sn-protoporfirina de participar como inhibidor de la enzima microsomal tanto "in vitro" como "in vivo".

I.2.4 REGULACION DE LA BIODEGRADACION DEL HEMO

El hemo celular es regulado en su metabolismo degradativo por el nivel de la HO. La importancia biológica de esta enzima proviene de su función, dado que cataliza la etapa inicial, de velocidad limitante de este camino y su dual importancia toxico-farmacológica por su sensibilidad a efectores regulatorios y potencial capacidad terapéutica.

La acción de la HO está modulada por un elevado número de factores aparentemente no relacionados (270, 279, 282). Algunos de ellos ejercen su efecto variando el nivel celular del hemo, mientras que otros lo hacen por efecto directo, o a través de sustancias no hémicas, sobre la actividad de la enzima y/o su concentración. Entre ellos se pueden destacar:

a) Hemo: Tenhunen y col. (291) fueron los primeros que informaron una estimulación de la HO en hígado de ratas previamente tratadas con hemoglobina o metahemoalbúmina. Shibahara y col. (292) demostraron que esta estimulación se acompaña de un aumento de la síntesis del mRNA funcional específico de esta proteína. Este modelo de inducción de la enzima por su sustrato, sugirió un rol fisiológico de la HO en el catabolismo del protohemo.

b) Iones metálicos pesados y de transición: Su efecto fue investigado inicialmente por Maines y Kappas (293) quienes encontraron que "in vivo", el ión Co^{2+} en forma inorgánica, elemento esencial para el hombre, actuaba como un potente inductor de la HO hepática. Otros metales como Cd, Sn, Ni, Hg,

Ag, As, Au, Cr, Cu, Fe, In, Mn, Pt, Sb han mostrado capacidad inductiva de magnitud variable y tejido específica en órganos como hígado, riñón, corazón, pulmón e intestino (279, 294). La potente y rápida inducción de la HO provocada por Co, Cd y Ni como cloruros se vió suprimida por inhibidores de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, tanto "in vivo" como "in vitro" (295, 296).

c) Metaloporfirinas sintéticas: Algunas metaloporfirinas, análogas del sustrato fisiológico, como Co-protoporfirina y Cd-protoporfirina son potentes inductores de la HO hepática (297). Recientemente se ha demostrado que la Sn- y Co-protoporfirina pueden actuar como inhibidores competitivos de la enzima hepática o como inductores de su síntesis, dependiendo el balance final de ambos efectos -en términos de velocidad neta del catabolismo de hemo- de la naturaleza del átomo metálico de la metaloporfirina (298).

d) Agentes químicos y biológicos: La actividad de la HO puede ser también inducida por la administración de insulina, glucagon, adrenalina o AMPc (299). La hormona tiroidea es un potente estimulador de su actividad, así como el ayuno prolongado y la adrenalectomia (282, 300). Compuestos químicos como el sulfuro de carbono bromobenceno, dietilmaleato y etionina aumentan también su actividad (301-304).

En general la actividad de la HO se incrementa cuando las células están sometidas a estrés o en estado de enfermedad.

Dada la gran variedad de factores que estimulan a la HO, se infiere que más de un mecanismo de acción podría operar en su modulación, dependiendo del agente inductor.

Con el propósito de estudiar los mecanismos moleculares de la inducción de la HO, el grupo de Shibahara (305, 306) ha clonado y caracterizado el gen de la enzima de rata. Su análisis sugiere la existencia de un único gen constituido por cuatro intrones, cinco exones y un número de secuencias de DNA en la región flanqueante 5', con potencial significancia no sólo como

inductoras sino como represoras de su transcripción. Ellas incluyen un elemento "sensible al calor", otro elemento que uniría un factor putativo de transcripción "sensible a hemo", y un elemento cis-actuante requerido para la precisa y eficiente iniciación de la transcripción desde su promotor específico (307, 308).

El gen de la enzima humana también contiene un elemento "sensible al calor" que sería funcional en ciertas líneas celulares por lo que habría mecanismos adicionales para la regulación de estos elementos.

I.3 PORFOBILINOGENO DEAMINASA

I.3.1 GENERALIDADES

La porfobilinógeno deaminasa [(PBG-D); uroporfirinógeno I sintetasa; hidroximetilbilano sintetasa; porfobilinógeno amonio-liasa (polimerizante); EC 4.3.1.8] cataliza la condensación de cuatro moléculas de PBG, único precursor de todos los núcleos tetrapirrólicos naturales (104, 310), para dar un intermediario abierto con la liberación de cuatro moléculas de amoníaco, que finalmente se transforma en URO'geno I (105, 108, 311-313) (Fig.7). Este último no es sustrato de la URO-CoS como tampoco lo es el PBG mientras que se transforma en la COPRO'geno I por acción de la URO-D.

I.3.2 CARACTERISTICAS

La PBG-D ha sido aislada y purificada parcialmente o a homogeneidad de numerosas fuentes, incluyendo bacterias (314-319) algas (320-322), plantas (127, 323-326), aves (327) y mamíferos (113, 114, 116, 120, 328-337). En la totalidad de las

fuentes investigadas la actividad está localizada en el citosol, aunque ha sido también detectada actividad en cloroplastos de espinaca (105) y de *E. gracilis* (338). En esta última fuente, la síntesis de clorofila a partir de glutamato ocurre en cloroplastos aislados por lo que se infiere la presencia de esta actividad en dicha organela (339).

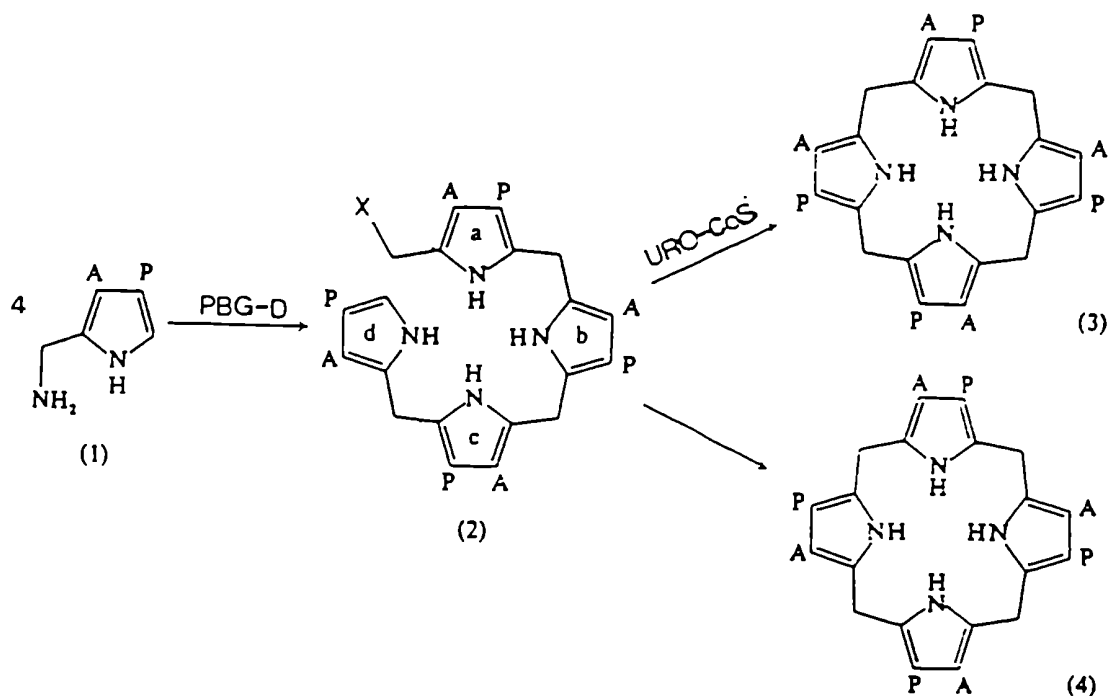


FIG.7: FORMACION DE URO'geno I y III.

1. PBG; 2. tetrapirrol abierto; 3. URO'geno III; 4. URO'geno I; A, acetato; P, pirovato.

La caracterización de la enzima en las distintas fuentes investigadas evidenció que se trata de una proteína monomérica con un PM entre 25.000 y 45.000.

Se han descrito formas heterogéneas de la enzima, respecto a su carga y/o tamaño, en eritrocitos humanos y bovinos

(329-331, 333, 335-337, 340), hígado y linfoblastos humanos (340), bazo de rata (332) y E. coli (319) y se han sugerido diferentes formas moleculares y postulado diversos mecanismos para su generación. Anderson y Desnick (331) han informado la existencia de cinco entidades estructurales para la enzima eritrocitaria humana y han adscripto dichas formas a intermediarios estables formados por la unión de un distinto número de moléculas de sustrato a la enzima durante el transcurso de la reacción. Por sus propiedades de estabilidad estos intermediarios serían compatibles con estructuras que involucran la unión de una, dos, tres y cuatro moléculas de sustrato a la PBG-D libre (Fig.8).

Miyagi y col. (329) han descripto la obtención de un número diferente de formas moleculares considerándolas como isoenzimas y favoreciendo la hipótesis de su generación por diferencias en el proceso de maduración de la enzima. Otros investigadores han propuesto mecanismos que implican modificaciones post-traduccionales (319, 335, 337, 341) o degradación proteolítica (332, 337).

Hart y col. (342) y Jordan y Warren (343) informaron para la enzima obtenida de E. coli, la existencia de un cofactor cuyas propiedades espectrales son las de un dipirrometano. Este sería responsable de la unión del sustrato dirigiendo la síntesis del tetrapirrol en el sitio catalítico. Ambos grupos demostraron que el cofactor se halla unido a un residuo cisteína (334, 335) (Fig.9). Se ha informado también su presencia en la enzima proveniente de eritrocitos humanos, cloroplastos y hojas de cebada (346).

La PBG-D cataliza la polimerización del PBG siguiendo la cinética de Michaelis-Menten. Los valores de K_m muestran un rango variado (1-85 μM) que depende de la fuente estudiada, siendo siempre mayores para las enzimas provenientes de organismos inferiores.

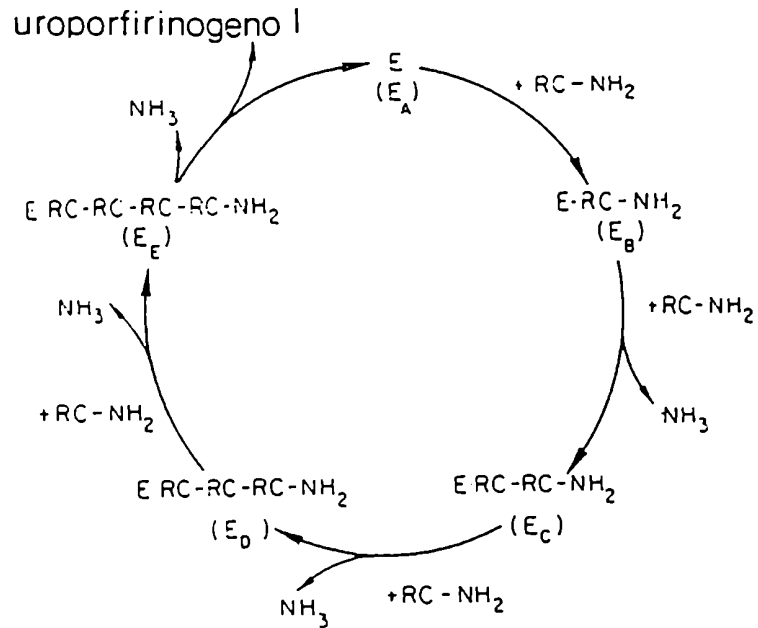


FIG. 8: ESQUEMA DE REACCION PROPUESTO PARA LA BIOSINTESIS DE URO'geno I CATALIZADA POR PBG- δ .

E_A, E_B, E_C, E_D, E_E = intermediarios enzima-sustrato; RC-NH₂ = PBG.

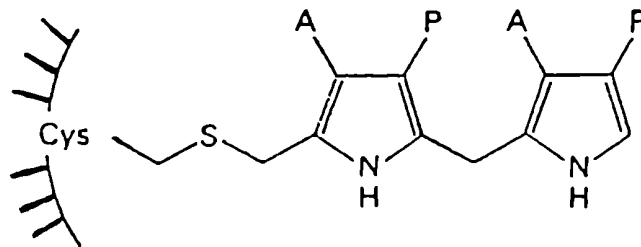


FIG.9: COFACTOR DIPIRROMETANO.

El PBG no tiene análogos naturales por lo tanto los estudios sobre especificidad de sustrato se realizaron utilizando pirroles sintéticos. Sus efectos sobre la actividad de la enzima de diferentes fuentes demostraron que monopirroles con al menos una posición α libre o sólo un grupo aminometilo o metilo en la otra posición α y dos grupos acetatos o propionatos en la posición β se comportan como inhibidores competitivos (114, 324, 347, 348).

Es una enzima termoestable, propiedad que es aprovechada especialmente para aislarla de la URO-Cos (105) y es activa en ausencia de oxígeno (105, 349).

El comportamiento de la actividad, medida como producto formado, frente al pH muestra valores máximos entre 7,2 y 8,2, según la fuente enzimática considerada (107).

Estudios realizados para determinar la presencia de ciertos aminoácidos en el proceso catalítico evidenciaron la importancia de grupos guanidinos y monotioles como fue demostrado por el grupo de Russell (350, 351) para la enzima de germen de trigo. Las PBG-D de eritocitos de pollo (327) e hígado bovino (352) se inhiben por agentes que clivan uniones disulfuro; por 2-metoxinitrotropona, así como por algunos ácidos, sugiriéndose una competencia de estos últimos con los carboxilatos del sustrato por grupos aminos libres de la proteína (restos ϵ -amino de lisinas o guanidino de argininas).

Se demostró la presencia de al menos un grupo lisina en el sitio activo de la enzima proveniente de germen de trigo (353), de E. gracilis y Rh. spheroides (354). Este hallazgo parece confirmarse por estudios con la proteína purificada de E. coli, en la que se identificaron dos grupos lisina, altamente conservados en otras PBG-D y cuya modificación indistinta, a nivel genético, produce una pérdida considerable de actividad (355).

Se sugirió además, que la enzima de germen de trigo requiere al menos un residuo triptofano para su actividad (356),

y que residuos aspártico o glutámico intervendrían en el proceso catalítico (357).

La PBG-D se inhibe por amonio e hidroxilamina, compuestos que presumiblemente, liberarían los precursores del producto final del sitio activo (358-360).

El grupo de Piper (128, 328, 361) encontró que el $PbCl_2$ inhibe la PBG-D eritocitaria de rata y no la hepática, a menos que se elimine un factor dializable de bajo PM y termoestable. Estudios de competencia en medios de crecimiento de microorganismos dependientes de folato, le permitieron asimilar a este factor, como un derivado pteroilglutamato, con potencial función regulatoria de la conversión de PBG a URO'geno. Posteriormente informó que se forma URO'geno III como producto de la acción de preparaciones de PBG-D libre de URO-CoS, en presencia de tetrahidrofolato y PBG. Smythe y Williams (336) demostraron, sin embargo, que compuestos derivados de folato no activan la deaminasa de eritrocitos humanos ni cumplen el rol de la URO-CoS.

I.3.3 MECANISMO DE LA REACCION

I.3.3.1 Autopolimerización del sustrato

La estructura del PBG tiene características únicas que podrían explicar su reactividad en cuanto a su capacidad de polimerizarse químicamente. El PBG es una base α -Mannich de un pirrol y como tal reacciona liberando amonio y formando un ion carbonio o el dieno equivalente que inicia la reacción de polimerización por ataque electrofílico sobre un segundo PBG (Fig.10). La reacción tiene lugar a través de la formación de un derivado intermediario α -pirrolenina (362 y referencias citadas). El ataque a la posición α libre (Fig.10A) predomina a pH ácido, mientras que el ataque a la posición α -sustituída (Fig.10B) se ve favorecida a pH neutro.

El ion imonio $(CH_2=NH_2)^+$ liberado puede recondensarse

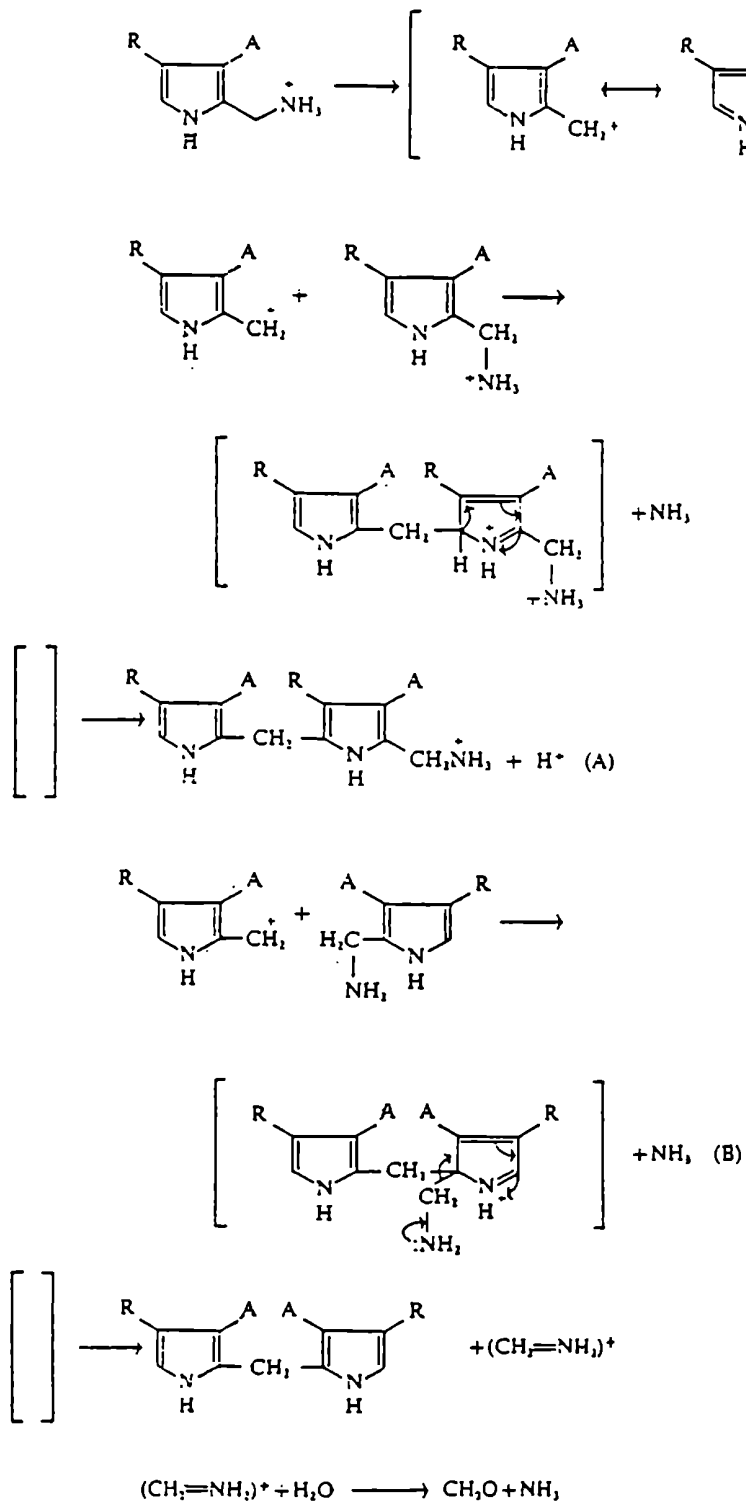


FIG.10: POLIMERIZACION QUIMICA DEL PEG.

(A) Reacción a pH ácido; (B) Reacción a pH neutro.

con el dipirrilmetano que tiene posiciones α y α' libres formando 2-aminometildipirrilmetano o bien puede hidrolizarse generando formaldehído y amonio. El formaldehído puede recondensarse también con el α α' -dipirrilmetano libre propagando la reacción de polimerización. Los 2-aminometildipirrilmetanos formados se autocondensan formando URO'genos (362).

Mauzerall (363) encontró que el formaldehído liberado durante la polimerización química del PBG-D bajo condiciones de anaerobiosis, calentamiento y pH ácido, neutro y básico, se incorpora desde el medio de reacción a los isómeros de los URO'genos formados.

Cuando el PBG se condensa a pH 3,5 los URO'genos se forman a menor velocidad que cuando la reacción se produce a pH 7,4. El rendimiento de URO'genos durante el proceso de autopimerización se incrementa con el tiempo de reacción, lo que indica que se forman intermediarios estables y discretos durante la consumición del PBG (363).

I.3.3.2 Identificación del producto de la reacción

La identificación del producto de la reacción catalizada por la PBG-D fue encarada como la búsqueda de la estructura polipirrólica máxima común a la formación de URO'geno I y III, y asociada con ella, la determinación del tipo de interacción espacial entre la PBG-D y la URO-CoS.

Dos tipos de aproximaciones se utilizaron: en la primera se usaron derivados sintéticos, 2-(aminometil)dipirrilmetanos, 2-(aminometil)tripirranos y 2-(aminometil)bilanos, como posibles intermediarios de la reacción enzimática que conduce a la síntesis de URO'genos (364-369). Los resultados obtenidos en estos estudios no fueron concluyentes debido a la baja incorporación de dichos compuestos en los URO'genos productos y a la capacidad de autopimerización que los mismos presentan.

La segunda, consistió en el estudio de la polimerización del sustrato natural marcado, (^{13}C)PBG, catalizada por la PBG-D, mediante el monitoreo por resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{13}C . Este método permitió la postulación de una serie de intermediarios tetrapirrólicos eventualmente liberados por la deaminasa que podrían actuar como sustratos de la URO-CoS (109, 370) llamándolos genéricamente "preuroporfirinógeno". Paralelamente Battersby y col. (110, 371) mostraron evidencias de que la estructura del intermediario buscado corresponde a la de un tetrapirrol abierto, el 2-(hidrometil)bilano (HMB) (Fig.11) y que la formación del URO'geno I resulta de la ciclación espontánea del HMB, que tiene lugar en ausencia de la URO-CoS. Sin embargo Scott y col. (372) aunque confirmaron la existencia del HMB informaron que el mismo no satisface totalmente los espectros obtenidos por ^{13}C RMN y ^{15}N RMN.

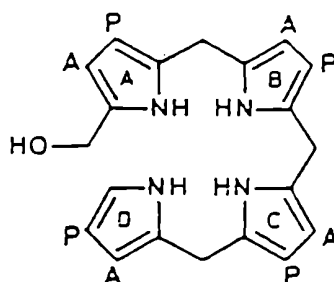
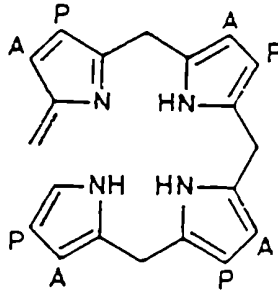


FIG.11: ESTRUCTURA DEL HIDROXIMETILBILANO.

A, acetato; B, propionato.

Evans y col. (317) estudiando la polimerización enzimática del (^3H)PBG con PBG-D de Rh. spheroides y empleando RMN de ^3H mostraron que se formaba URO'geno I sin que se detectara el HMB.

Estos resultados se atribuyeron a la elevada concentración proteica utilizada que estabilizaría la especie azafulveno (Fig. 12) liberada por la enzima antes de la formación del HMB.



FIS.12: ESTRUCTURA DEL AZAFULVENO.

A, acetato; B, propionato.

Scott y col. (373) propusieron que si bien el HMB es usado eficientemente como sustrato por la URO-CoS, las especies tetrapirrólicas inestables liberadas por la reacción de la PBG-D indicarian que el azafulveno es el sustrato "verdadero" de la URO-CoS.

Rosé y col. (374) en incubaciones de PBG-D con (^{13}C)PBG detectaron por RMN un intermediario tetrapirrólico, diferente del HMB, débilmente unido a la enzima. Este complejo enzima-tetrapirrol se comporta como un sustrato eficiente de la cosintetasa para la síntesis de URO'geno III.

1.3.3.3 Identificación de complejos intermediarios enzima-sustrato

El mecanismo por el cual la PBG-D cataliza la formación del

tetrapirrol a partir de PBG ha sido investigado mediante experimentos de recambio simple con sustrato marcado. Se estableció que la condensación de las cuatro moléculas del pirrol sigue un mecanismo de ensamblaje secuencial ordenado, "cabeza a cola", adicionándose primero el anillo A y consecutivamente el B, el C y finalmente el D (371, 375, 376).

En condiciones normales la PBG-D no libera intermediarios entre el PBG y el tetrapirrol, prefiriendo sintetizar a este último a través de un mecanismo de estadios discretos que involucra complejos constituidos por la unión de diferente número de unidades pirrónicas a la enzima (362).

Anderson y Desnick (331) identificaron por primera vez las especies enzima-sustrato(s) ($E-S_n$) a partir de PBG-D de eritrocitos humanos incubada con (3H)PBG y sometida a electroforesis. Detectaron cinco bandas radioactivas que se atribuyeron a los complejos enzima- mono, di, tri y tetrapirrol además de la correspondiente a la enzima libre.

La existencia de pirrimetanos intermediarios covalentemente unidos a la enzima fue también detectada por otros investigadores (377, 378).

Recientemente Warren y Jordan (379) han propuesto el siguiente mecanismo para la reacción catalizada por PBG-D de E. coli (Fig.13). Consideran la presencia de un único sitio activo responsable de la catálisis de las dos reacciones básicas: 1) desaminación del sustrato y condensación del mismo con el cofactor dipirrometano (DPMC) o con alguno de los complejos intermediarios $E-S_n$; 2) clivaje hidrolítico para dar HMB. Esta reacción está normalmente restringida a la liberación del producto, pero en ausencia de sustrato, cualquiera de los intermediarios $E-S$ formados puede ser clivado, aunque a velocidad menor que el producto final. La topografía del centro catalítico presentaría dos sitios de reconocimiento del PBG, uno para el sustrato entrante (sitio S) y otro (sitio C) que permitiría acomodar un anillo pirrónico con su posición

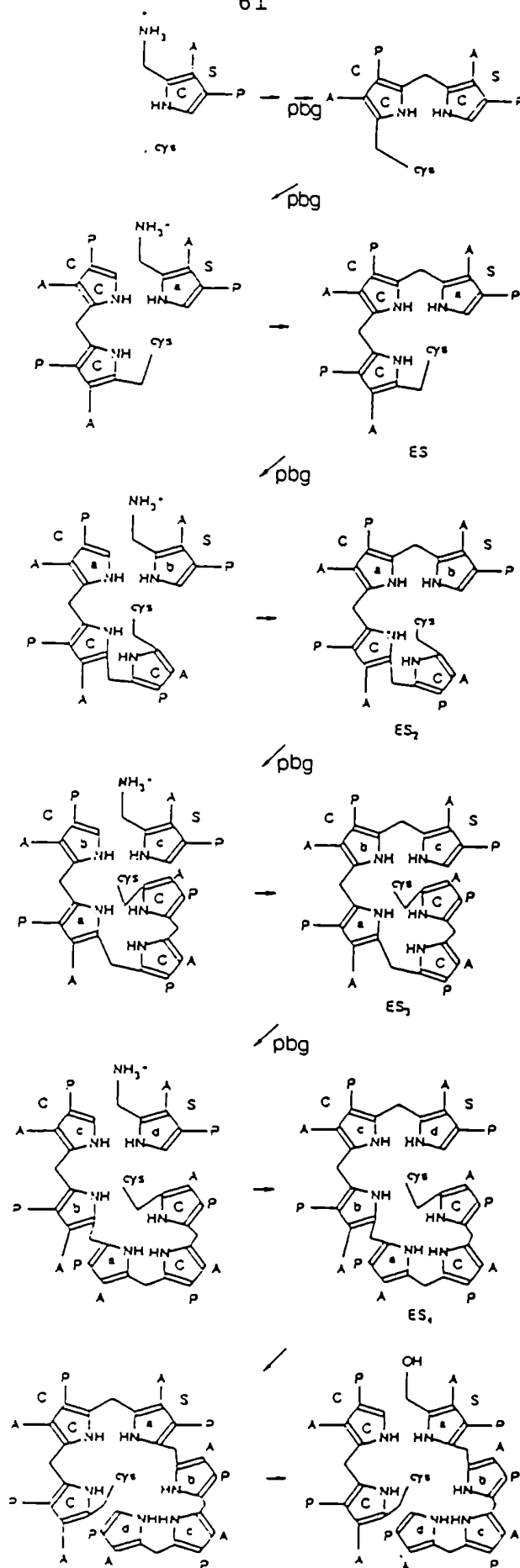


FIG.13: MECANISMO DE REACCION PROPUESTO PARA LA REACCION CATALIZADA POR PS6-D.

S, sitio S; C, sitio C; A, acetato; P, propionato.

ál libre lista para su condensación con el sustrato del sitio S. En la holoenzima este segundo sitio estaría ocupado por el DFMC.

En el caso de la apoenzima, primero se produciría la condensación de dos moléculas de PBG y su anclaje a una cisteína para formar el DFMC permitiendo que la PBG-D asuma su configuración estable de holoenzima.

El primer sustrato entrante ocuparía el sitio S y reaccionaría con el DFMC que actúa como cebador. El complejo E-DFMC-S₁ se traslocaría de modo tal que el pirrol recientemente unido ocupe el sitio C permitiendo así que una nueva molécula de PBG ocupe el sitio S para que ocurra la siguiente desaminación y formación del complejo intermediario E-DFMC-S₂. Cuando se logra el complejo final, E-DFMC-S₄, consideraciones estéricas impedirían la unión de más sustrato produciéndose entonces el clivaje hidrolítico cuyo resultado es la liberación del HMB, que normalmente ocurre a menor velocidad que las reacciones de condensación.

El DFMC cumpliría dos funciones: 1) actuaría como un "primer" de la reacción, 2) impondría una restricción estérica del número de anillos pirrólicos que pueden ser incorporados.

Se comprobó además, que los complejos intermediarios con una, dos y tres moléculas de sustrato son transformados enzimáticamente en HMB -aún cuando se incubaran en ausencia de PBG- mediante reacciones de intercambio que involucrarían a la unidad pirrólica terminal, que puede ser removida como hidroxipBG, y reaccionar con cualquiera de los complejos intermediarios presentes (379)(Fig.14).

I.3.4 ASPECTOS MOLECULARES

El gen estructural de la PBG-D humana ha sido localizado en el cromosoma 11 en la región 11q23 → 11qter (380, 381).

Grandchamp y col. (382) aislaron el primer cDNA de PBG-D a partir de mRNA de bazo de rata anémica. El mismo se utilizó

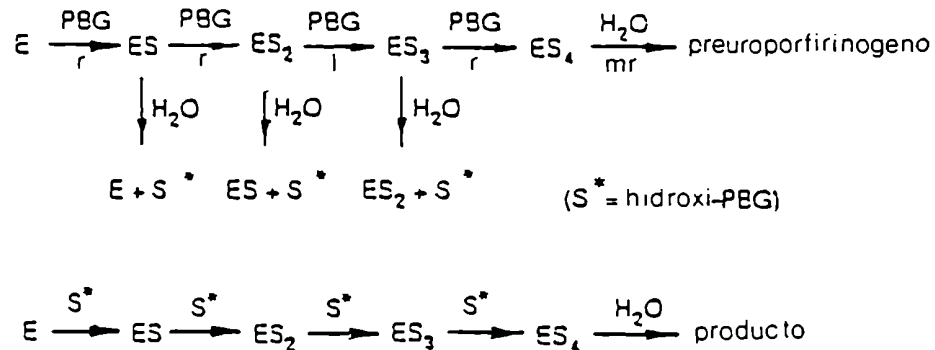


FIG.14: CICLO CATALITICO DE LA PBG-D EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PBG.

r, rápida; *l*, lenta; *mr*, muy rápida.

para obtener cDNA humano de fuentes eritroidea y no eritroidea (383, 384).

La estructura primaria de la PBG-D de eritrocitos humanos deducida a partir de la secuenciación del cDNA demuestra que es una proteína compuesta por 344 aminoácidos coincidiendo los del extremo NH₂-terminal con los obtenidos a partir del estudio de la proteína purificada (383).

El análisis del cDNA no eritroide revela un extremo 5' no relacionado con el de la forma eritroide, consistente en una secuencia que codifica para un péptido de 17 aminoácidos adicionales. Este hecho coincide con la diferencia de PM que ambas formas proteicas exhiben en análisis por SDS-PAGE e inmunotransferencia (384).

Los investigadores franceses, en una serie de excelentes trabajos de biología molecular (384-385) han demostrado la existencia de dos isoformas de esta enzima con localización

diferenciada: una ubicua, que se expresa en todas las células del organismo y la otra tejido específica, restringida exclusivamente a tejidos eritropoyéticos. Han demostrado además, que si bien un solo gen estructural codifica ambas isoenzimas, ellas son traducidas a partir de dos mRNAs que difieren sólo en sus regiones 5' terminales. El gen codificante tiene al menos 10 kb de largo y está compuesto por 15 exones y 14 intrones, transcribiéndose en dos mRNAs distintos por un mecanismo de ruptura alternativa de dos transcriptos primarios solapados, siendo generados por dos promotores diferentes. Así, la enzima ubicua se traduce de un mRNA compuesto por 13 exones comunes (3 al 15) y el exón 1 adicional en su extremo 5'; mientras que para la enzima eritroide (tejido específica) sólo se traducen los 13 exones de la región común, aunque su mRNA posee el exón 2 como región "cap". El primer promotor, que es activo en todas las células, tiene características estructurales propias de un promotor ubicuo y se encuentra "cadena arriba" en la región flanqueante 5'. El segundo, activo sólo en células eritroides, más cercano en la región 5', "cadena abajo" de su sentido de iniciación, sugiere una organización modular que pareciera común a promotores específicos de células eritroides. Demostraron además, que los niveles de mRNA de PBG-D en diferentes líneas celulares humanas son modulados, tanto por la naturaleza eritroide del tejido, como por la proliferación celular (386, 387).

Thomas y Jordan (388) han clonado y secuenciado el gen de la PBG-D de E. coli.

La comparación de las secuencias de aminoácidos deducidas de sus secuencias genómicas indican un 90% de identidad entre las enzimas eritocitarias de rata y humana (389) y un 65% de identidad entre éstas y la de la enzima de E. coli. Por otra parte, la PBG-D de E. gracilis evidencia un 60 a 70% de similitud tanto con las enzimas de mamíferos como con la de E. coli (390).

I.4 PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE

I.4.1 GENERALIDADES

Las porfirias constituyen un grupo de enfermedades metabólicas provocadas por alteraciones en el camino de la biosíntesis del hemo. Presentan una distribución mundial, sin embargo, algunas formas predominan en determinados países y más aún en regiones de los mismos.

Dentro de las enfermedades producidas por desórdenes en este camino, las porfirias han sido las más estudiadas. A pesar de que la bioenzimología ha revelado con precisión cual es la enzima específicamente defectiva en cada tipo de porfiria y que los estudios bioquímicos como el análisis de metabolitos hémicos en excretas y medición de las actividades enzimáticas posibilitan el diagnóstico de los diferentes tipos, la relación entre la patofisiología de cada una de ellas y su manifestación clínica respectiva no se conocen claramente. Los análisis a nivel molecular están revelando heterogeneidad en varias de ellas, abriendo paso al estudio de las causas de las eventuales variaciones en las manifestaciones clínicas de cada una de ellas.

Dentro de las porfirias hepáticas agudas, la porfiria aguda intermitente (PAI) es una enfermedad autosomal dominante, cuyo defecto primario se debe a la deficiencia parcial de la enzima PBG-D, cuya actividad se halla reducida al 50% del valor normal en los distintos tejidos y tipos celulares investigados: hígado (391, 392), eritrocitos (349, 393, 394), fibroblastos (395, 396), células amnióticas (396) y linfocitos estimulados con mitógenos (397), lo que implicaría que la expresión sería relativamente constante. Sin embargo la enfermedad tiene como órgano blanco el hígado, en el cual el bloqueo parcial enzimático originaría un desbalance de los mecanismos regulatorios existentes en el hepatocito produciendo un efecto

despresor sobre la primera enzima del camino (ALA-S) por disminución de la síntesis de hemo.

La existencia de portadores latentes de este defecto avala la existencia de factores adicionales que permiten su manifestación fenotípica, es decir que el defecto enzimático sería necesario pero no suficiente para la expresión bioquímica y clínica.

En diferentes poblaciones se ha encontrado un rango de incidencia entre 1,2 y 8/100.000, su ocurrencia sería, sin embargo, más frecuente debido a la existencia de portadores asintomáticos (398). Además la incidencia de portadores manifiestos es significativamente mayor en mujeres que en hombres (399).

Este tipo de porfiria no presenta síntomas dermatológicos, pero representa el prototipo para el estudio de los ataques agudos, los cuales son comunes a otros dos tipos de porfirias, menos frecuentes, que cursan con manifestaciones cutáneas, como la porfiria variegata y la coproporfiria hepática (398).

I.4.2 MANIFESTACIONES CLINICAS

La PAI permanece latente desde el punto de vista clínico en la mayoría de los individuos portadores (7). Su expresión se manifiesta después de la pubertad y por lo general entre los 20 y 40 años de edad, siendo muy variable la frecuencia y severidad de los ataques.

Los signos y síntomas dominantes son de carácter neurológico y psiquiátrico (7). El más común es una neuropatía autonómica que causa dolores abdominales, vómitos y constipación los que pueden llegar a ser severos y prolongados, taquicardia e hipertensión, así como también paradójicamente hipotensión postural y retención urinaria (229). Estas manifestaciones parecen estar relacionadas con un desbalance de la neurotransmisión colinérgica y adrenérgica. Menos frecuente

es la manifestación de neuropatía motora que puede involucrar paresis y parálisis de los músculos de las extremidades, cuadriplegia, parálisis respiratoria y paresis bulbar.

También se han observado alteraciones que involucran estructuras hipotalámicas en la región de los núcleos supraóptico y paraventricular (400) que conllevan a una inapropiada secreción de la hormona antidiurética (7). La hiponatremia resultante junto con la disminución de la concentración de magnesio sérico, que ocurre en ocasiones, serían causales de los episodios tetánicos (401).

Entre las anormalidades psiquiátricas pueden citarse una conducta histérica, depresión, confusión y pseudopsicosis (402).

A pesar de la variedad de estudios realizados, no se ha podido demostrar fehacientemente, que la acumulación de ALA y PBG alteren la estructura y la función neural (403), sugiriéndose que la disponibilidad restringida de hemo para las oxidaciones enzimáticas y las reacciones productoras de energía constituyan probablemente la relación entre los defectos bioquímicos y las manifestaciones clínicas.

Recientemente, Litman y Correia (404, 405) postularon al L-triptófano como el común denominador de los eventos bioquímicos y neurológicos que acontecen en las porfirias agudas. Según estudios realizados en animales de experimentación, la inducción de una depleción aguda de hemo disminuye la actividad de la triptófano pirrolasa lo que provoca un aumento de las concentraciones de triptofano y 5-hidroxitriptamina, efecto que se revierte por la administración de hemo.

Por otra parte, si los niveles de hemo hepático son aumentados por administración de ALA, la producción de 5-hidroxitriptamina se ve inhibida por la disminución de la disponibilidad de triptofano a través de la activación de la triptófano pirrolasa hepática (406).

I.4.3 RASGOS BIOQUIMICOS

Durante las crisis los pacientes excretan por orina cantidades marcadamente aumentadas de ALA y PBG (50 a 200 mg/día) siendo la de ALA aproximadamente la mitad de la de PBG. En individuos clínicamente manifiestos, la excreción de los metabolitos permanece aumentada después de la remisión clínica. También puede aparecer aumentada en individuos clínicamente no manifiestos. A veces se observa un aumento de la excreción de URO y otras porfirinas en pacientes con PAI que presentan altos niveles de precursores siendo en parte el resultado de la ciclación no enzimática del PBG. El color rojizo oscuro de la orina que presentan los pacientes con PAI puede deberse a la presencia de las mencionadas porfirinas y/o a la formación de porfobilina, un producto del PBG (402, 407) o a la presencia de dipirrometanos (408). Graham y col. (409) informaron en pacientes con PAI latentes y manifiestos, agudos o en remisión, la presencia en orina de un segundo monopirrol, el hidroxihemopirrolin-2-ona.

Las porfirinas fecales pueden aparecer levemente aumentadas.

Los niveles de ALA y PBG se hallan elevados en suero, pudiendo alcanzar durante los ataques valores de 20 a 300 µg/dl.

Se han encontrado contenidos elevados de PBG en hígado y riñón provenientes de autopsias, no así en médula ósea y se ha detectado la presencia de URO en hígado (410).

Las pruebas de función hepática son usualmente normales salvo una alteración en la excreción de bromosulfoftaleína (411).

Se ha informado la existencia de pacientes con una significativa hipercolesterolemia (412) y en algunos casos elevados niveles de tiroxina y de su proteína transportadora en suero (413).

I.4.4 FACTORES DE PRECIPITACION

La deficiencia enzimática por sí misma no conlleva la eclosión o exacerbación de la enfermedad a menos que factores fisiológicos o ambientales adicionales coexistan.

La manifestación o la crisis pueden ocurrir en portadores adultos del defecto genético por cuatro factores principales: 1) drogas de uso terapéutico, particularmente barbituratos, sulfonamidas, clordiazepóxidos, hidantoínas, glutarimidias, succinimidias, etc. o xenobióticos variados (229). Sin embargo, porfiricos latentes han sido expuestos a drogas porfirinogénicas sin experimentar síntomas agudos, por lo tanto factores permisivos serían además necesarios para completar la potencial característica que ciertas drogas poseen de producir crisis agudas. 2) hormonas esteroides, particularmente aquellas que conducen a la síntesis de cortisol. Estos estrógenos son conocidos inductores de la ALA-S y explicarían el hecho de que mujeres portadoras del defecto genético no lo manifiesten hasta la pubertad y de que en ciertos casos los síntomas agudos estén relacionados con los períodos menstruales y la gravidez (414), para disminuir después de la menopausia. Kappas y col. (229) han propuesto que la expresión clínica del defecto está relacionada con la alteración de la 5- α -reducción de las hormonas esteroides en el hígado, que se halla reducida en portadores clínicamente manifiestos. 3) dietas hipocalóricas y ayunos prolongados, debido al efecto que los carbohidratos tienen sobre la síntesis del hemo (415). 4) enfermedades sistémicas, las cuales hacen imperativa la utilización de antibióticos no contraindicados.

I.4.5 DEFECTO GENETICO

Waldenström (416), basándose en el estudio de familias con PAI, fue el primero en postular un carácter autosomal dominante

para su herencia.

La medición de la actividad de la PBG-D en sangre periférica permitió la detección de portadores no manifiestos y corroboró el ya mencionado carácter hereditario mendeliano de esta patología. Se observó en estudios familiares un porcentaje aproximadamente igual de individuos portadores y normales y una relación aproximadamente igual de individuos portadores frente a normales para ambos sexos (417).

I.4.5.1 Heterogeneidad molecular de la PAI

Todos los portadores investigados de PAI son heterocigotas. Estudios llevados a cabo tanto a nivel proteico (418-422) como a nivel génico (423, 424) indicaron que esta patología es una enfermedad heterogénea a nivel molecular.

La utilización de métodos inmunológicos permitió la clasificación de los individuos con PAI en dos grandes grupos. Uno de ellos, constituido por el 85% de los portadores, no produce proteína reconocible por un anticuerpo policlonal generado contra la enzima eritrocitaria nativa. Presenta una relación de material inmunológico de reacción cruzada (CRIM)/ actividad enzimática de PBG-D idéntica a la de los individuos controles, asignándosele un valor arbitrario igual a 1. Es decir una equivalente reducción de la actividad enzimática e inmunológica de la PBG-D eritrocitaria y se lo designa CRIM-negativo. El otro grupo, con actividad de PBG-D eritrocitaria reducida aproximadamente al 50% del valor normal produce cierta cantidad de proteína reconocida por el anticuerpo, aunque no funcional catalíticamente y se lo designa CRIM-positivo (418).

Desnick y col. (419) hallaron, en estudios de familias no relacionadas pertenecientes a diferentes grupos étnicos o demográficos, cuatro subgrupos. Uno de ellos, denominado CRIM-negativo tipo 1 presenta actividad de PBG-D eritrocitaria

disminuida al 50%. Otro, CRIM-negativo tipo 2, exhibe las características clínicas y bioquímicas de la PAI pero presenta actividad de PBG-D eritrocitaria normal. Con respecto al grupo CRIM-positivo se hallaron los subgrupos tipo 1, con una relación de CRIM/actividad enzimática de PBG-D = 1,7, y el tipo 2 con un valor para esta relación de 5,7. Estos estudios les permitieron sugerir que mutaciones puntuales más que deleciones del gen serían las causales más frecuentes del defecto.

Wilson y col. (420) observaron en la población holandesa porfírica una similar distribución de la heterogeneidad de la PAI.

La determinación de las mutaciones responsables de los diferentes subtipos de PAI ha comenzado recientemente. Se han informado dos mutaciones puntuales independientes que producen una ruptura defectiva del intron 1 y que serían responsables del subtipo de PAI, muy poco frecuente, para el cual el defecto enzimático se manifiesta sólo en tejido no eritroide (425, 426).

Para la más común de las formas de PAI, CRIM-negativo, con deficiencia de la actividad en todos los tipos celulares, no se han informado aún mutaciones responsables del defecto. Sin embargo un estudio preliminar indicó una anomalía en el procesamiento post-transcripcional del mRNA que podría ser responsable del defecto (427).

Con referencia a los portadores CRIM-positivos, Grandchamp y col. (428) encontraron una mutación puntual al final del exón 12 responsable de su eliminación durante la maduración post-transcripcional y de la producción de una proteína estable y no funcional con 40 aminoácidos menos que la normal, que es reconocida por el anticuerpo.

1.4.5.2 Diagnóstico

Desde 1930 el diagnóstico de la PAI se basaba en la determinación de cantidades aumentadas de PBG en orina (416,

429, 430). Sin embargo, esta excreción aumentada sólo se observa en un tercio de los casos latentes, según estudios realizados en familias francesas y británicas (431, 432).

Desde hace aproximadamente dos décadas la medición de la PBG-D en eritrocitos se utiliza para la detección de portadores de PAI (349, 393, 394, 433-436), pero debido a que se produce un solapamiento entre los valores de actividad de individuos portadores y controles (437-439) y a la existencia de portadores manifiestos con actividad de PBG-D eritrocitaria normal (419, 440), este método de diagnóstico no siempre asegura con certeza la identificación de los portadores de la falla genética

Se ha encontrado que la actividad de la enzima varía con el grado de maduración de la célula eritroide (441, 442), habiéndose encontrado valores elevados de actividad eritrocitaria en enfermedades hemolíticas (442), también en afecciones hepáticas crónicas (443) y en enfermedades linfoproliferativas (444). Se han informado además, valores disminuidos de la actividad en casos de poliartritis crónica (443) y urémicos crónicos (445).

Fisiológicamente la PBG-D eritrocitaria se halla incrementada durante los primeros meses de vida, por lo tanto los valores obtenidos durante ese período deben interpretarse con precaución (446).

La introducción de métodos inmunológicos para cuantificar la proteína, conjuntamente con la determinación de su actividad enzimática ha permitido la identificación de algunos portadores inciertos en estudios familiares (447, 448). Más precisión aportan los métodos de genética molecular, como el análisis de polimorfismos ligados al gen de la PBG-D, especialmente en los casos de portadores latentes inciertos (423, 424).

Un diagnóstico preciso depende entonces de una combinación de información genealógica, clínica y bioquímica.

I.4.6 TERAPEUTICA

El primer tratamiento, que se utiliza desde hace veinticinco años, es la administración de carbohidratos en exceso (229, 449). Esta terapia estaría basada en la habilidad de la glucosa de disminuir la síntesis de porfirinas en hígado. La mayor desventaja de la misma es que no resulta efectiva en todos los pacientes, desconociéndose la o las causas de su ineficiencia; no obstante se la recomienda como tratamiento de base de un ataque agudo (229, 449, 450).

El otro tratamiento utilizado es la administración endovenosa de hematina introducido por Bonkowsky y col. (451) en Estados Unidos en 1971. La racionalidad de su efecto se debería a la represión de la porfirinogénesis con la consiguiente disminución de una o más sustancias tóxicas y/o la reposición exógena del hemo endógeno deficiente.

En general el éxito de la terapéutica practicada con hematina parece estar influenciado por la duración y severidad de los síntomas previos a su administración. Si el tratamiento se aplica tempranamente en el curso de un ataque, la recuperación es generalmente buena (248, 452).

La hematina es usualmente bien tolerada, pero puede tener algunos efectos colaterales cuando se la administra en dosis altas y a tiempos cortos, como tromboflebitis (453, 454) y alteraciones en la cascada de coagulación (455, 456). La mayor desventaja que limita su uso es su inestabilidad, habiéndose propuesto recientemente que sus efectos indeseables son causados por los productos de su descomposición antes que por el hemo "per se". Pierach (457) ha sugerido que cuando la hematina se inyecta fresca se une inmediata y completamente a proteínas, preferentemente a hemopexina, previniendo así sus efectos adversos sobre la coagulación.

Otras terapias fueron propuestas por Jusic y col. (458) quienes informaron sobre la administración por largos periodos

de corticosteroides y por Doner y col. (459) quienes lo hicieron sobre la administración de elevadas dosis intravenosas de propranolol. Estas terapias a pesar de haber tenido éxito, tendrían efectos colaterales indeseables que requerirían un continuo control de los pacientes. Además sus mecanismos de acción no han sido aclarados.

Wider de Xifra y col. (460) han informado que la administración oral de ácido fólico, en pacientes con ataques agudos, produce mejoría clínica y bioquímica.

Recientemente, Anderson y col. (461, 462) han reportado que ataques asociados a la menstruación pudieron prevenirse por la administración subcutánea diaria y por largo tiempo de un agonista análogo de la hormona liberadora de la hormona luteinizante.

Objetivos

Los antecedentes enunciados en la Introducción muestran a la PBG-D como la enzima clave de la patología hepática humana: Porfiria Aguda Intermitente.

Con la finalidad de profundizar en el estudio bioquímico-molecular de esta enzima y aportar datos que permitan descifrar los mecanismos fisiopatológicos de la PAI y tomando en cuenta los conocimientos preexistentes hasta el inicio de este trabajo, se propuso esta investigación que comprende los siguientes objetivos específicos:

- a) Aislar la enzima hepática de rata para lograr una metodología accesible y reproducible con muestras humanas y caracterizarla.
- b) Identificar y caracterizar la PBG-D de hígado humano, órgano diana de esta patología.
- c) Abordar estudios comparativos de las isoenzimas humanas, y la hepática de rata.
- d) Obtener anticuerpos contra la enzima eritrocitaria humana para el análisis poblacional de portadores de PAI.
- e) Realizar el seguimiento y análisis estadístico de la terapéutica con hematina.

II. Materiales y Métodos

II.1 MATERIALES

II.1.1 DROGAS, REACTIVOS Y ACCESORIOS

PBG y patrones de porfirinas libres y esterificadas se adquirieron en Porphyrins Products, Utah (USA).

Los marcadores de FM, coeficiente de sedimentación y pI; los inhibidores de proteasas; glutation reducido, ditioneitol, cisteína, cistina, p-cloromercuribenzoato de sodio, N-etilmaleimida, 5, 5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), iodoacetamida, fosfato de piridoxal, Azul de metileno, Rosa de Bengala, dietilpirocarbonato, fenilglioxal, reactivo K de Woodward, 1-ciclohexil-3-(2-morfolino-4-etil) carbodiimida, DEAE-celulosa, adyuvantes de Freund, inmunoglobulina anti-IgG de conejo (en cabra) y agarosa se adquirieron a Sigma Chemical Co., St. Louis (USA).

Los diferentes tipos de Sephadex, Phenyl Sepharosa, Azul de Dextrano, agarosa IEF y anfolitos se obtuvieron de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (Suecia).

DE-52 se compró a Whatman Inc., New Jersey, (USA).

Los materiales usados para electroforesis en gel de poliacrilamida provinieron de Laboratorios Bio-Rad, Richmond (USA).

Todas las demás drogas y reactivos de grado analítico empleados, se procedieron de fuentes comerciales nacionales.

Las mallas de acero inoxidable fueron marca Spectrum (USA) de tamaño de apertura variable (300-800 μm).

Las membranas utilizadas para ultrafiltración fueron marca Amicon.

II.1.2 ANIMALES

Se utilizaron: a) Ratas Wistar adultas de 150 a 300 g sin tratamiento, para la obtención de tejido hepático. b) Ratas Sprague Dawley machos y hembras (fetos, neonatos, prepúberes y adultas) para la obtención de tejido hepático. c) Conejos New Zealand, adultos, machos, para la obtención de anticuerpos.

Los animales provinieron del Bioterio de la F.C.E. y N.

II.1.3. MUESTRAS HUMANAS

Se utilizó tejido hepático, proveniente de material remanente de biopsias quirúrgicas, hepatectomías y de autopsias (6 a 10 hs. "post-mortem") de personas de ambos sexos adultas, y de autopsias de neonatos (6 a 10 hs "post-mortem") provisto por diversos servicios hospitalarios. En todos los casos la observación histológica del material no reveló anomalías importantes.

Las muestras de sangre se obtuvieron de donadores voluntarios sanos provenientes de servicios de hemoterapia. Las muestras utilizadas para isoelectroenfoques y electroinmunoensayos se obtuvieron de donadores voluntarios (controles) y portadores de PAI.

II.2 METODOS

II.2.1 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE PBG-D

La actividad enzimática se midió fluorométricamente, según el método de Kreimer-Birnbaum y Tomio (394), determinando la cantidad de producto formado (URO'geno I) después de su conversión a porfirina. La mezcla estándar incluyó 20 nmoles de PBG, 10 μ moles de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 7,5 ó 7,6

y la cantidad de enzima adecuada en un volumen final de 100 μ l. Las incubaciones se realizaron a 37°C en oscuridad y aerobiosis durante 30 a 60 minutos. La reacción se detuvo por el agregado de 800 μ l de una mezcla acetato de etilo:acético (2:1 v/v) y las porfirinas se extrajeron de la fase orgánica en 1 ml de HCl 0,5 M. Se realizaron blancos de enzima o sustrato a 37°C y ensayos a tiempo 0, 30 y 60 min de incubación a 4°C.

La medición de las porfirinas se realizó en un espectrofotofluorómetro Aminco-Bowman previamente calibrado con soluciones de sulfato de quinina en ácido sulfúrico 0,1 N. Se utilizaron longitudes de onda de excitación y emisión: 405 y 595 nm respectivamente; y como patrones de referencia URO I y COPRO III libres.

El análisis y la composición isomérica de las porfirinas se realizó por el método de Doss (463). La unidad enzimática (U), se definió como la cantidad de enzima requerida para catalizar la formación de 1 nmol de tetrapirrol, medido como URO I, por hora, en las condiciones de temperatura, pH y fuerza iónica indicados en la determinación de actividad.

En algunos ensayos, la actividad enzimática se cuantificó midiendo el PBG remanente con el reactivo de Ehrlich según el método de Urata y Granick (464).

En los experimentos en que se quiso determinar el efecto de reactivos específicos, éstos se incorporaron al medio de incubación, o se incubaron con la enzima previamente al ensayo de su actividad como se indica en cada caso.

II.2.2 DETERMINACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry y col. (465) utilizando seroalbúmina bovina como proteína patrón.

La elución de proteínas de las columnas cromatográficas se

siguió por la medición de absorbancia a 260 y 280 nm de acuerdo al método descrito por Warburg y Christian (466) y empleando la ecuación propuesta por Kalckar (467); o bien a 280 nm y asumiendo un valor de absorbancia para una concentración de 1 mg/ml, en una cubeta de 1 cm de paso de luz igual a 1 (468).

II.2.3 PURIFICACION DE ENZIMAS

II.2.3.1 Hígado de rata

Se empleó como buffer A: fosfato de sodio 5 mM, pH 7,5.

Los hígados de los animales muertos por decapitación, se perfundieron "in situ" con varios volúmenes de solución fisiológica. Todas las operaciones se realizaron a 4°C. Se disectaron y se homogeneizaron en 4 volúmenes de KCl 1,15%. La suspensión se centrifugó a 11.000 xg, 20 min para eliminar los restos celulares y mitocondrias. El sobrenadante se calentó a 55-60°C durante 10 min, con agitación suave. La suspensión se enfrió y se centrifugó a 8.000 xg durante 10 min. El sobrenadante se usó o se guardó a -20°C conservando su actividad después de tres meses.

Al sobrenadante de calentamiento se agregó sulfato de amonio sólido hasta obtener una saturación del 35%. Se centrifugó a 8.000 xg durante 20 min y el sobrenadante obtenido se llevó a 60% de saturación de la sal. Se mantuvo la agitación por 30 min y se centrifugó a 8.000 xg durante 20 min. Durante los agregados de sulfato de amonio se mantuvo el pH a 7,5 por adición de amoníaco. El pellet resultante se resuspendió en buffer A y se dializó durante toda la noche contra el mismo buffer.

La fracción dializada se puso en contacto con DEAE-celulosa (forma fibrosa) en "batch" equilibrada con el buffer A. Después de 30 min de agitación, la resina se lavó con dos volúmenes de buffer A y la enzima se eluyó con 3 volúmenes de

buffer fosfato de sodio 0,134 M, pH 7,5. El eluido se concentró mediante ultrafiltración con membrana Amicon PM-10.

La fracción concentrada se sembró en una columna de Sephacryl S-200 (2,2 x 60 cm) eluyéndose la misma con buffer A a un flujo de 35 ml/h. Se recogieron fracciones de 2 ml, reuniéndose las de mayor actividad específica.

El "pool" de elución se sembró inmediatamente en una columna de DEAE-celulosa microgranular (2 x 30 cm) equilibrada con buffer A. La elución se realizó a un flujo de 60 ml/h, usando un gradiente lineal 0-0,2 M de KCl (300 ml) en el mismo buffer. Se reunieron las fracciones con mayor actividad específica, se concentraron y la muestra resultante se congeló a -20°C.

II.2.3.2 Hígado humano

II.2.3.2.1 Eliminación de la contaminación eritrocitaria

Se emplearon las siguientes soluciones: solución B: sacarosa 0,25 M, EDTA 5 mM y solución C: sacarosa 0,25 M, EDTA 5 mM, fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) 0,1 mM.

El procedimiento adoptado comprendió las siguientes operaciones realizadas a 4°C: Se lavó el material 3-4 veces con solución fisiológica. Se secó el tejido con papel de filtro y se retiró y descartó el tejido conectivo que recubre la cápsula. Se lo dividió en trozos de 2-3 g y se los colocó sobre una hoja de papel de filtro humedecido soportado en un vidrio plano, donde se procedió al corte en trozos muy pequeños (0,5-1 mm de espesor) mediante una hoja de bisturí. Se reunió todo el material en un cristizador que contenía solución fisiológica y se agitó suavemente esta suspensión con una varilla de vidrio en forma discontinua. Se dejó reposar y se descartó el sobrenadante con una pipeta Pasteur conectada a una bomba de agua. Esta operación se repitió varias veces hasta obtener

sobrenadantes prácticamente incoloros. Se suspendió el material en la solución B en una relación de 1-2 volúmenes por gramo de tejido durante 15 minutos, se dejó decantar y se eliminó el sobrenadante. Se colocaron los trozos en etapas sucesivas sobre una malla de acero inoxidable ($400 \mu\text{m}$) montada sobre un recipiente cilíndrico de vidrio o acrílico que contenía un volumen por gramo de tejido de solución C y se procedió a realizar una filtración forzada mediante la aplicación de presión suave y movimientos giratorios realizados con un émbolo de teflón (2,5 cm de diámetro). Se retiró el material pasado a través de la malla, pero adherido a ella, con la ayuda de una espátula y se lo reunió con el filtrado. Una vez que todo el material se procesó en las condiciones mencionadas, se lavó el residuo (R) sobre la malla con un volumen por gramo de tejido de la solución C. La suspensión obtenida se designó fracción inicial (FI). Se pesó el residuo que no pasó por la malla. Se centrifugó la suspensión a $600 \times g$ durante 10 min y se separó un sobrenadante "inicial" (Sn_1) y un precipitado (Pdo_1). Se resuspendió este precipitado en 2 volúmenes de solución C y se centrifugó a $200 \times g$ durante 3 minutos, se separó el sobrenadante y el precipitado obtenido se lavó 3 veces con un volumen de solución C. El precipitado final se designó Pdo_3 . Los líquidos de lavado se reunieron con el sobrenadante separado, designándose a toda esa fracción Sn_2 . El Pdo_3 se resuspendió en un volumen de solución C.

En cada una de las fracciones se determinó la actividad de PBG-D y el contenido proteico total, como se indicó en las secciones II.2.1 y II.2.2; y el contenido de Hb siguiendo el método de Crosby y Furth (469). También se midió espectrofotométricamente a 415 nm la recuperación relativa de Hb (en %) respecto de FI, después de cromatografiar 0,5 a 1 ml de cada una de las fracciones por columnas de DEAE-celulosa (microgranular) ($0,5 \times 6$ cm) equilibradas con buffer Tris-HCl 0,05 M, pH 8,5 y eluidas con buffer Tris-HCl 0,05 M, pH 7,0

según lo indicado por Efremov y col. (470).

II.2.3.2.2 Purificación

Se empleó como buffer D: fosfato de sodio 10 mM, pH 7,6.

Durante el procedimiento de purificación se agregaron a todas las soluciones de trabajo los siguientes reactivos PMSF 0,1 mM; aprotinina 3 μ g/ml; EDTA 0,5 mM y clorhidrato de benzamidina 1 mM.

La fracción Sn₁, rica en componentes citoplasmáticos de hepatocitos, provenientes de aproximadamente 60 a 200 g de tejido hepático, se centrifugó a 11.000 xg durante 30 min. El sobrenadante se calentó con agitación suave a 55-60°C durante 7 min; se enfrió inmediatamente y se centrifugó a 11.000 xg, 10 min. Se hizo un fraccionamiento con sulfato de amonio entre 35 y 60% de saturación, manteniéndose el pH (7,6) por agregado de amoníaco. El pellet resultante se resuspendió en buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 6,8 y se dializó durante toda la noche contra el mismo buffer.

La fracción clarificada por centrifugación se sembró en una columna de DEAE-celulosa (fibrosa) de 2,5 x 17 cm equilibrada con el buffer de la muestra. La resina se lavó con 2 volúmenes de este buffer y luego con 2 volúmenes de KCl 25 mM en buffer D. La elución, a un flujo de 80 ml/h, se realizó con 2,5 volúmenes de KCl 250 mM en buffer D. El eluido total se concentró por ultrafiltración. La muestra obtenida se llevó a una concentración 1,2 M de sulfato de amonio y se sembró en una columna de Phenyl Sepharosa (1,5 x 6 cm) equilibrada con buffer D conteniendo 1,2 M de sulfato amonio. Se eluyó a un flujo de 50 ml/h con un gradiente discontinuo formado por distintas soluciones de sulfato de amonio en buffer D, i.e.: 60 ml de solución 1,2 M; 30 ml de solución 0,6 M; 60 ml de solución 0,2 M; luego 90 ml de buffer D, y finalmente 260 ml de agua destilada llevada a pH 7,6. Se recogieron fracciones de 5 ml y

la actividad enzimática de las mismas se midió previa diálisis contra el buffer D. Aquellas con mayor actividad específica se reunieron y concentraron por ultrafiltración.

La muestra obtenida se sembró en una columna de Sephadex G-100 (2,2 x 60 cm). La elución se realizó recogiendo fracciones de 3 ml, a un flujo de 26 ml/h en buffer D. Las fracciones con mayor actividad específica se reunieron y se sembraron en una columna de DE-52 de 1,1 x 20 cm. La elución se realizó con un gradiente lineal de KCl 0-0,2 M en buffer D (220 ml), recogiendo fracciones de 2 ml a un flujo de 40 ml/h. Las fracciones con mayor actividad específica se reunieron y concentraron por ultracentrifugación. La muestra obtenida se sembró en una columna de Sephadex G-75 (1,1 x 60 cm) y la elución se realizó con buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,6, recogiendo fracciones de 1 ml a un flujo de 20 ml/h. Las fracciones con mayor actividad específica se reunieron y concentraron por ultracentrifugación. La fracción así obtenida se recromatografió en idénticas condiciones y la preparación obtenida se concentró nuevamente y se conservó dividida en alícuotas a -20°C.

II.2.3.3 Eritrocitos humanos

En todas las soluciones de trabajo se adicionaron los reactivos -inhibidores de proteasas- especificados en la sección anterior (II.2.3.2.2).

Los eritrocitos se obtuvieron a partir de sangre anticoagulada (200-250 ml), se lavaron con solución fisiológica (3 veces) eliminando los glóbulos blancos y se lisaron por congelamiento con un volumen de buffer fosfato de sodio 3 mM, pH 6,8. El hemolizado se centrifugó a 8.000 xg, 10 min y el sobrenadante se puso en contacto ("batch") con DEAE-celulosa fibrosa, equilibrada con el buffer de lisado, manteniendo una relación de 1 ml de resina por 1 ml de hemolizado y se agitó

durante 30 min. La resina se lavó con el mismo buffer hasta eliminación de la Hb no adsorbida y luego con 4 volúmenes del mismo buffer conteniendo NaCl 20 mM. La elución de las proteínas se realizó con 1 volumen (5 veces) de buffer fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5 conteniendo NaCl 0,2 M.

El eluido se fraccionó en alícuotas de 100 ml que se calentaron 10 min a 55-60°C. Las suspensiones se enfriaron en baño de hielo y centrifugaron a 8.000 xg, 10 min. El sobrenadante se concentró mediante precipitación con sulfato de amonio a 70% de saturación. Las proteínas se sembraron en una columna de Sephadex G-100 (2,2 x 80 cm) equilibrada con buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,5. La elución se realizó con el mismo buffer recogiendo fracciones de 3 ml a un flujo de 28 ml/h. Las fracciones con mayor actividad se reunieron y concentraron por ultrafiltración. La muestra obtenida, previa diálisis contra buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7,2, se sometió a una electroforesis preparativa según el método de Davis (471) utilizando geles planos (12x16x0,2cm) y concentración 7,7% T y 2,5% C para el gel separador, y 4,6% T y 2,5% C para el gel concentrador. La zona que contenía la mayor actividad enzimática -banda más catódica- se cortó y eluyó en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5 durante 16 hs. Se reunieron los eluidos de varias placas, se concentraron por ultrafiltración y se congelaron a -20°C.

II.2.4 DETERMINACION DEL GRADO DE PUREZA

II.2.4.1 Electroforesis en condiciones no desnaturalizantes

Las corridas se realizaron en geles de poliacrilamida cilíndricos (12x0,7 cm) o planos (12x16x0,1 cm) según el método de Davis (471), formados por un gel concentrador de 4% T, 2,6% C y un gel separador de 7,5% T y 2,6% C. Las muestras se corrieron a 4°C durante 4 hs, en condiciones de amperaje

constante (4 mA/gel cilíndrico o 2 mA/cm para gel plano). Se usó Azul de bromofenol como indicador del frente de corrida.

Los geles se fijaron, tñieron con Azul brillante de Coomassie R-250 y decoloraron según instrucciones del Manual de Canalco (472). Para tinciones rápidas se usó Azul brillante de Coomassie G-250, siguiendo la técnica de Reisner y col. (473).

II.2.4.1.1 Detección de la actividad enzimática en geles

Para la detección de la actividad, los geles se cortaron en trozos de 2 mm y se incubaron 100 min en un volumen final de 150 μ l conteniendo PBG 0,2 mM y buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5. La reacción se detuvo colocando los tubos en un baño de hielo, se removieron los geles y se agregó a la mezcla de reacción 0,5 ml de HCl 10% (p/v). Las porfirinas libres se midieron fluorométricamente, según se indicó en la sección II.2.1.

II.2.4.2 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

Las corridas se realizaron en geles planos (12x16x0,1 cm) preparados con un gel separador de 9 ó 10% T según el método de Laemmli (474). Se utilizó como buffer de corrida Tris 0,0125 M -glicina 0,096 M, pH 8,3 conteniendo 10% SDS.

Las muestras se trataron con un volumen de mezcla desnaturalizante (50 μ l de 2-mercaptoetanol, 300 μ l de SDS 10%, 125 μ l de buffer de corrida, 500 μ l de glicerol y 50 μ l de Azul de bromofenol 0,05%) durante 5 min a 80°C.

La corridas se realizaron a 4°C y a 2 mA/cm durante 4 hs. Los geles se fijaron y revelaron según instrucciones del Manual de Canalco (472).

II.2.5 DETERMINACION Y CALCULO DE PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS

II.2.5.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes y determinación de PM

Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes se desarrollaron según se indicó en la sección precedente. En las diferentes corridas se utilizaron alternativamente las siguientes proteínas marcadores de PM: fosforilasa B de músculo de conejo (97.400), seroalbúmina bovina (66.000), ovoalbúmina (45.000), gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa de músculo de conejo (36.000), anhidrasa carbónica de eritrocitos bovinos (29.000), tripsinógeno de páncreas bovino (24.000) y β -lactoglobulina bovina (18.400). Los PM de las proteínas en estudio se determinaron por interpolación en los gráficos obtenidos de la representación de las movilidades relativas de las proteínas marcadoras en función de sus PM.

II.2.5.2 Filtración molecular por geles de dextrano y estimación de PM

Se usó filtración por gel de Sephadex G-100, empleando columnas de 2,5x90 cm ó 1,1x80 cm. El volumen de exclusión se determinó con Azul de dextrano. Las condiciones de siembra y elución se indican en cada caso. Para la calibración de las columnas se utilizaron las siguientes proteínas marcadoras, las que se determinaron midiendo su absorbancia. Sus parámetros característicos se resumen en la siguiente tabla:

PROTEINA	PM $\times 10^{-3}$	Radio de Stokes (r_s) (Å)	Absorbancia (λ en nm)
Seroalbúmina bovina			
dímero	132	43,5	230
monómero	66	35,0	230
Ovoalbúmina	45	27,3	230
Anhidrasa carbónica	29	24,0	230
Citocromo C	12,4	16,4	410

Los valores de los volúmenes de elución (V_e) de las proteínas se obtuvieron de sus respectivos perfiles de elución, y se representaron gráficamente en función de sus PM, estimándose en cada caso el correspondiente a la PBG-D en estudio, según el método de Andrews (475).

II.2.5.2.1 Determinación del radio de Stokes

Los valores del radio de Stokes (r_s) de las PBG-D se obtuvieron gráficamente, según el método de Laurent y Killander (476) representando $(-\log K_{av})^{1/2}$ versus r_s de las proteínas marcadoras. El K_{av} se define como la relación:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad \text{siendo: } V_o: \text{ volumen de exclusión}$$

V_t : volumen total de la columna

V_e : volumen elución proteína

Todos estos datos se obtuvieron de los estudios de filtración por geles.

II.2.5.3 Ultracentrifugación en gradientes de sacarosa

Se prepararon gradientes lineales de sacarosa 5-20% en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5 conteniendo NaCl 0,1 M. Para ello, se depositaron capas sucesivas de soluciones de sacarosa de concentraciones 20; 17,5; 15; 12,5; 10; 7,5; y 5% respectivamente, cada una de 0,65 ml, y se dejaron reposar 2 horas a temperatura ambiente. Luego se los enfrió a 4°C y se sembró en cada uno la muestra adecuada junto con los marcadores. Las preparaciones se sometieron a centrifugación durante 16 hs. a 40.000 rpm y 4°C en una ultracentrifuga Beckman LB-55 con rotor SW 55Ti. Al finalizar la corrida, los gradientes se descargaron haciendo sifón mediante un catéter conectado a una bomba peristáltica. Se recogieron fracciones de

0,2 ml en las que se determinaron los marcadores y la actividad de PBG-D. Las proteínas marcadoras con sus respectivos coeficientes de sedimentación ($s_{20,w}$) expresados en S fueron: fosfatasa alcalina de E. coli (6,3 S); peroxidasa de rábano picante (3,5 S) y citocromo C de corazón bovino (1,7 S).

II.2.5.3.1 Medición de las proteínas marcadoras

Catalasa: Se midió la actividad enzimática valorando el sustrato no consumido (H_2O_2) con solución IK (477).

Fosfatasa alcalina: Se dosó a 410 nm midiendo el p-nitrofenol liberado, según la técnica descrita en el manual de Worthington (478).

Peroxidasa: Se midió dosando a 460 nm el color desarrollado por la O-dianisidina oxidada al descomponerse el H_2O_2 según la metodología descrita por Maehly y Chance (479).

Citocromo C: Se valoró por espectrofotometría en el visible, midiendo la absorbancia a 410 nm.

II.2.5.3.2 Estimación del coeficiente de sedimentación

Los $s_{20,w}$ de las PBG-D se obtuvieron a partir de los datos de sedimentación en gradientes de sacarosa. Se graficó la distancia recorrida por los marcadores desde el menisco del gradiente (expresada en cm) en función de sus coeficientes respectivos, y se interpoló el valor para la proteína en estudio según el método de Martin y Ames (480).

II.2.5.4 Cálculo del peso molecular

El PM de cada una de las enzimas se calculó de acuerdo al método de Siegel y Monti aplicando la fórmula:

$$PM = 6 \cdot \pi \cdot N \cdot \eta_{20,w} \cdot r_s \cdot s_{20,w} / (1 - \bar{v}) \rho_{20,w}$$

Siendo N= Número de Avogadro; s= coeficiente de sedimentación;

η = viscosidad del agua a 20°C; r_s = radio de Stokes;

\bar{v} = volúmen específico parcial (0,725 cm³/g);

ρ = densidad del agua a 20°C.

II.2.5.5 Cálculo del cociente friccional y de la relación axial/ecuatorial

Para calcular los cocientes friccionales se utilizaron los parámetros moleculares previamente obtenidos (r_s y PM) que se relacionan mediante la siguiente fórmula propuesta por Siegel y Monti (481):

$$f/f_0 = r_s (4 N/3 \cdot PM \cdot \bar{v})^{1/3}$$

Siendo: f = cociente de fricción de la proteína

f_0 = cociente de fricción de la proteína esférica y anhidra de igual masa.

Con el valor de f/f_0 y mediante las ecuaciones de Perrin (482) y del volumen de un elipsoide de revolución prolato, se calcularon la relación axial/ecuatorial (a/b) y los valores absolutos de ambos ejes (a y b) de acuerdo a las consideraciones formuladas por Neurath (483), así como el radio de una esfera equivalente anhidra.

II.2.5.6 Isoelectroenfoque en gel de agarosa

Las corridas se realizaron en geles planos horizontales de agarosa IEF (11×11×0,1 cm) preparados según el manual de Pharmacia (484) en una cuba LKB 2117 Multiphor II a 4°C. Se utilizó una fuente de poder LKB 2297 Macro Drive 5 y se trabajó

a potencia constante (8 W) durante 2 hs. Se emplearon anfolitos con rangos de pH 4-6,5 y 5-8. Las muestras se sembraron en papeles (0,5x1 cm) y consistieron en preparaciones purificadas de la enzima de diferentes fuentes o extractos crudos y/o calentados según se especifica en cada caso.

Una vez finalizadas las corridas, los geles se procesaron y tificaron para visualizar proteínas según instrucciones (484).

II.2.5.6.1 Detección de actividad en geles de agarosa.

Para detectar la actividad de PBG-D, después del isoelectroenfoque de las proteínas en estudio, los geles se cortaron en trozos de 5x1 mm, se incubaron y se midió el producto formado según se describió en la sección II.2.4.1.1.

Para la detección de los perfiles de isoelectroenfoque de los extractos proteicos, los geles se colocaron en contacto con papel Whatman 3 MM embebido en solución 0,8 mM de PBG en buffer Tris-HCl 0,3 M pH 8,3 a 45°C durante 60 a 90 min. Las bandas fluorescentes se visualizaron después de 10 min de exposición bajo luz ultravioleta y se fotografiaron inmediatamente.

II.2.5.6.2 Determinación del punto isoeléctrico

La obtención de los perfiles de pH en función de la distancia al cátodo se logró mediante la utilización de marcadores de pI como se indica en cada caso; o bien midiendo el pH sobre las placas mediante un microelectrodo de superficie, inmediatamente de finalizada la corrida a 4°C.

Los valores de pI se determinaron midiendo la distancia al cátodo de las enzimas enfocadas, e interpolando sus valores en el gráfico de pH versus la distancia recorrida por las proteínas marcadoras o por los anfolitos enfocados en el gel.

II.2.6 ANALISIS ESPECTRAL

Los espectros de absorción de las proteínas puras se registraron en un espectrofotómetro Shimatzu UV-3000 entre 200 y 900 nm.

II.2.7 ESTUDIOS CINETICOS

Para la determinación de K_m y $V_{m\acute{a}x}$ se utilizó el tratamiento de Lineweaver-Burk (485) aplicado a los datos obtenidos en el estudio de las velocidades iniciales (v) en función de las concentraciones de sustrato $[S]$, según la ecuación de Michaelis-Menten.

Los estudios de dependencia de actividad de PBG-D con el pH se realizaron utilizando diversos buffers para cubrir un rango amplio de pH según se indica en cada caso.

Los datos obtenidos del estudio de la dependencia de la velocidad con la temperatura se utilizaron para calcular la energía de activación de la reacción enzimática, a través de la ecuación de Arrhenius, una de cuyas formas de expresión es:

$$d \ln k / dt = E_a / R \cdot T^2$$

de su integración se obtiene la siguiente fórmula:

$$\log k = c - E_a / 2,303 R \cdot T$$

siendo E_a : energía de activación; k : constante de velocidad de la reacción; R : constante ideal de los gases; T : temperatura absoluta (K) y c : constante (factor de frecuencia).

Se graficó el log de la velocidad (proporcional a k) en función de la temperatura absoluta de la reacción. De la pendiente de

las rectas se obtuvieron los valores de Ea.

II.2.8 COMPOSICION DE AMINOACIDOS

Para el análisis de aminoácidos, muestras de enzima purificada (50 µg) se hidrolizaron al vacío en HCl 6M conteniendo 1 mg/ml de fenol durante 20 y 40 hs a 110°C (486). El contenido de cistina más cisteína se estimó como ácido cisteico después de una oxidación con ácido perbórmico previa a la hidrólisis (487).

La composición aminoacídica se determinó con un analizador de aminoácidos Beckman 119 CL.

II.2.9 ESTUDIOS INMUNOLOGICOS

II.2.9.1 Producción de anticuerpos

Los conejos se inmunizaron mediante inoculaciones intramusculares en ambas patas traseras, con PBG-D hepática animal (300 µg) emulsionada con adyuvante de Freund completo (1:1 v/v) para la primera inyección y con adyuvante de Freund incompleto (1:1 v/v) para las posteriores que se realizaron cada 15 días durante cuatro meses. Los animales se sangraron por la arteria central de la oreja a partir de la quinta semana después de la primera inyección. Los sueros se conservaron a -20°C.

Las diversas fracciones de suero se reunieron y el volumen total se precipitó con sulfato de amonio sólido hasta 40% de saturación a 4°C. Después de dos horas la fracción se centrifugó a 10.000 xg durante 30 min, el precipitado obtenido se redisolvió en un volumen de buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 7,4 conteniendo NaCl 0,15 M igual al 40% del volumen inicial del suero, y se dializó contra la misma solución. El anticuerpo (IgG-anti-PBG-D animal) se fraccionó en alícuotas y se conservó a -20°C.

Para la producción de anticuerpos contra PBG-D eritrocitaria humana se siguió un esquema de inoculación semejante al descrito para la enzima animal, pero las primeras dos inyecciones se realizaron con enzima nativa contenida en gel de poliacrilamida disgregado en solución fisiológica y posteriormente emulsionado con adyuvante de Freund completo (1:1 v/v). Las restantes inoculaciones se realizaron con enzima eluida del gel (100 μ g) emulsionada con adyuvante de Freund incompleto (1:1 v/v).

El tratamiento de los sueros y la obtención de la IgG-anti-PBG-D eritrocitaria humana se realizó como se indicó anteriormente.

II.2.9.2 Inmunodifusión en gel

La técnica de doble difusión de Duchterlony (488) se usó para: a) estimar semicuantitativamente el título de los antisueros durante las inoculaciones y, b) examinar la pureza inmunológica de las enzimas y comparar éstas con la proveniente de otras fuentes (hígado humano). Se hicieron los respectivos controles con los sueros obtenidos antes de iniciar los esquemas de inoculación o realizando los mismos con inyecciones de adyuvante solamente.

Los experimentos de inmunodifusión se realizaron sobre portaobjetos, en agar al 1,5% en solución fisiológica. Los geles se incubaron durante 48 hs a temperatura ambiente en cámara húmeda, se lavaron con solución fisiológica, se secaron y revelaron con Azul brillante de Coomassie R-250 para la visualización de las bandas de inmunoprecipitación.

II.2.9.3 Inmunotitulación y electroinmunoensayo

La inmunotitulación del anticuerpo (IgG-anti-PBG-D eritrocitaria humana) obtenido se realizó utilizando cantidades

constantes de unidades enzimáticas de proteína purificada, y lisado de glóbulos rojos (GR)(un volumen de GR lavados más tres volúmenes de agua destilada) a las cuales se agregaron diluciones seriadas de IgG-anti-PBG-D eritrocitaria en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4 conteniendo NaCl 0,1 M. Se trabajó siempre con una concentración final de proteínas de 80 mg/ml que se obtuvo mediante el agregado de seroalbúmina bovina. Los controles se realizaron con IgG de conejo no inoculado con la enzima. Las mezclas se incubaron 60 min a 37°C, después de lo cual se agregó a cada una de ellas una cantidad constante de anti-IgG de conejo generado en cabra (70 µl). Las muestras obtenidas se dejaron toda la noche a 4°C, y al día siguiente se centrifugaron a 15.000 xg durante 45 min. La actividad enzimática remanente se midió en el sobrenadante utilizando el ensayo estándar indicado en la sección II.2.1.

La técnica de electroinmunoensayo o "rocket" inmunolectroforesis (489) se puso a punto con el antígeno eritrocitario y se empleó para cuantificar la proteína PBG-D inmunorreactiva en lisados de eritrocitos preparados a partir de GR lavados, diluidos al 25% en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4. Para la misma se utilizaron geles de agarosa 1,5% en buffer Tris-HCl 0.050 M, pH 8,6 de 1,0 mm de espesor; las corridas se realizaron en cuba refrigerada a 13 mA durante 3 hs. Los geles se lavaron con solución fisiológica, se prensaron bajo papeles de filtro y se tñieron con Azul brillante de Coomassie R-250. Se realizaron curvas de calibración con la enzima purificada.

II.2.10 ESTUDIO POBLACIONAL

La determinación cuali y cuantitativa de los índices hémicos característicos ALA, PBG y porfirinas se realizó en diferentes líquidos y excretas biológicos de individuos controles y pacientes porfíricos según metodologías de rutina en nuestro laboratorio (392, 490-492). Estas comprenden

separaciones en resinas de intercambio iónico, por solubilización en mezclas de solventes orgánicos, por cromatografías en placa delgada; reacciones de colorimetría, etc.

Los estudios de familia se proyectaron después de identificado un portador, que en la mayoría de los casos, se presentó en estado de crisis aguda.

Se hicieron mediciones en sangre de actividad enzimática de PBG-D según el método Kreimer-Birnbaum y Tomio (394), determinaciones de sus pI según se describe en sección II.2.5.6 y dosaje de proteína inmunorreactiva según se detalla en la sección II.2.9.3.

Para la obtención de hematina se partió de GR humanos de sangre provista por Servicios de Hemoterapia garantizada apta para transfusión. Se aisló y cristalizó hemina de acuerdo al Método de Fisher (493); se obtuvo hematina solubilizándola en carbonato de sodio 0,25%. Se preparó para su administración según lo descrito por Watson y col. (494).

El dosaje de hematina en suero se realizó según el método de Dhar y col. (230).

III. Resultados y Discusión

III.1 PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE PBG-D DE TEJIDO HEPATICO DE MAMIFEROS

III.1.1 Enzima de hígado de rata

III.1.1.1 Purificación

Se inició el estudio de la PBG-D hepática, utilizando como modelo el hígado de rata, con dos objetivos parciales: a) seleccionar los procedimientos más eficaces, para ser aplicados en la obtención de la enzima humana, en el tejido que es blanco de la alteración porfírica y que es de muy difícil acceso (biopsias o hepatectomías); b) abordar estudios comparativos de la enzima de diferentes especies.

En hígado de rata adulta, sin tratamiento, esta enzima muestra una actividad muy baja, uno a dos órdenes de magnitud menor, cuando se la compara con la enzima proveniente de eritrocitos humanos (331, 336, 337), de bazo de rata tratada con fenilhidracina (332) y especialmente con la de plantas y microorganismos (315, 316, 322, 324).

La determinación de la actividad basal en este órgano mostró un valor de $5,01 \pm 0,50$ U/g de tejido, con un rango de 4,41 a 5,51 U/g, medida como formación de URO I.

La actividad de la PBG-D hepática de rata exhibió cambios en sus niveles basales en función del tiempo de vida, así, sus valores en el período prenatal (fetos de 16 a 18 días) fueron 20 a 24 veces mayores a los del adulto ($110,2 \pm 11,7$ U/g de tejido), en el período neonatal 5 a 7 veces mayores ($30,1 \pm 3,5$ U/g de tejido) y en el período postnatal alcanzaron los niveles del adulto, recién 8 días después del nacimiento. Se

deduce que el nivel de la PBG-D aumentado en tejido fetal hepático corresponde a los focos de hemopoyesis que se desarrollan en el mismo, existiendo buena correlación entre la migración de la función hemopoyética y dicho incremento.

Cuando se ensayó la actividad en homogenatos de hígado de rata preñada no se observó variación de los valores respecto de los obtenidos en estadios puberal o adulto (hembra o macho).

La enzima de hígado de rata adulta se purificó a homogeneidad y los resultados correspondientes a las diferentes etapas del esquema de purificación utilizado se hallan resumidos en la Tabla I.

TABLA I: CUADRO DE PURIFICACION DE PBG-D DE HIGADO DE RATA^a

Los detalles experimentales de cada etapa y el ensayo estándar de formación de URO I se indican en Metodos.

Etapa	Proteínas (mg)	Act. esp. (U*/mg)	Purific.	Rto. (%)
1.Homogenato	15.280	0,036	1	100
2.Sn 11.000xg	8.645	0,054	1,5	85
3.Calentamiento	1.902	0,230	6,4	80
4.Precipitación Salina	859	0,394	10,9	61
5.DEAE-celulosa batch	134	1,69	47	41,1
6.Sephacryl S-200	15,0	8,92	248	24,3
7.DEAE-celulosa	3,1	36,2	1.005	20,4

^a A partir de 100 g de hígado.
 *U = naol de URO I/h

Los ensayos con homogenatos de hígado de rata previamente perfundido para eliminar la sangre contaminante mostraron una actividad específica de $0,036 \pm 0,006$ U/mg de proteína y un valor de $36,2 \pm 6,8$ U/mg para la enzima pura, con un rendimiento de aproximadamente 20%. Cabe destacar que para obtener enzima purificada en el orden de miligramos se requiere partir de cientos de gramos de tejido, lo que sugiere que la proteína en estudio está presente en baja proporción.

La preparación después del calentamiento produjo solamente URO I. No obstante, las condiciones seleccionadas para la medición de la actividad aseguran la formación de este isómero o sólo trazas del isómero III en los primeros pasos de purificación, como se verificó por cromatografía en placa delgada (463). El calentamiento a 60°C por 5 min resultó un método selectivo que permitió separar la enzima de una gran cantidad de proteína contaminante (más del 75%) y a la vez, con casi no pérdida de la actividad total. Estos resultados ratifican el carácter termoestable de esta enzima. La proteína así purificada precipitó en el rango 35-60% de saturación de sulfato de amonio.

El tratamiento en "batch" de las proteínas con la resina aniónica permitió eliminar totalmente los restos de Hb presentes.

El perfil cromatográfico obtenido por pasaje a través de Sephacryl S-200 como puede observarse en la Fig.15 muestra un único pico de actividad que eluye después del pico mayor de proteínas. Es de destacar que siempre se observó en este paso una pérdida significativa de la actividad, cercana al 50%, hecho que puede deberse a la baja concentración proteica con la cual eluye.

La cromatografía en columna por la resina DEAE-celulosa resolvió la actividad enzimática total en un sólo pico que eluyó a una concentración de KCl 95 mM (Fig.16). La proteína recromatografiada dió un único pico de proteína y actividad.

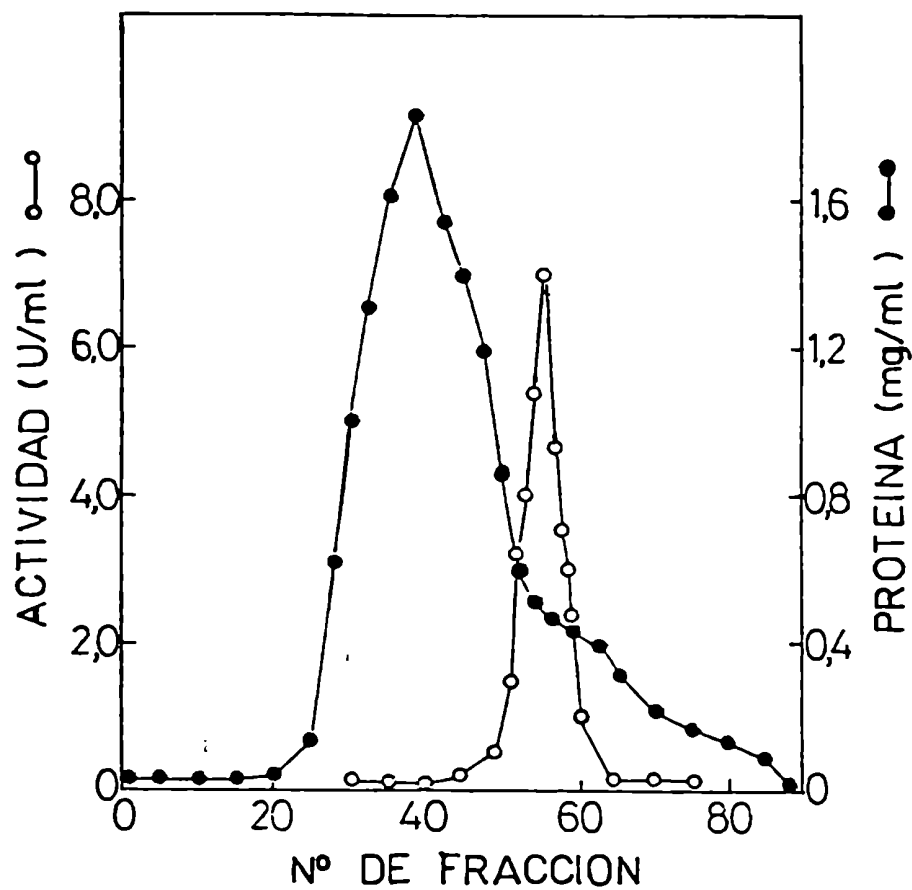


FIG.15: PERFIL DE ELUCION EN SEPHACRYL S-200.

La fracción proveniente de la etapa de DEAE-celulosa batch (70 mg de proteínas) se sembró en una columna de Sephacryl S-200 equilibrada con buffer A.

La elución y la medición de proteínas y actividad se realizó según se indica en Métodos. Las fracciones con mayor actividad específica (52 a 59) se concentraron por ultrafiltración.

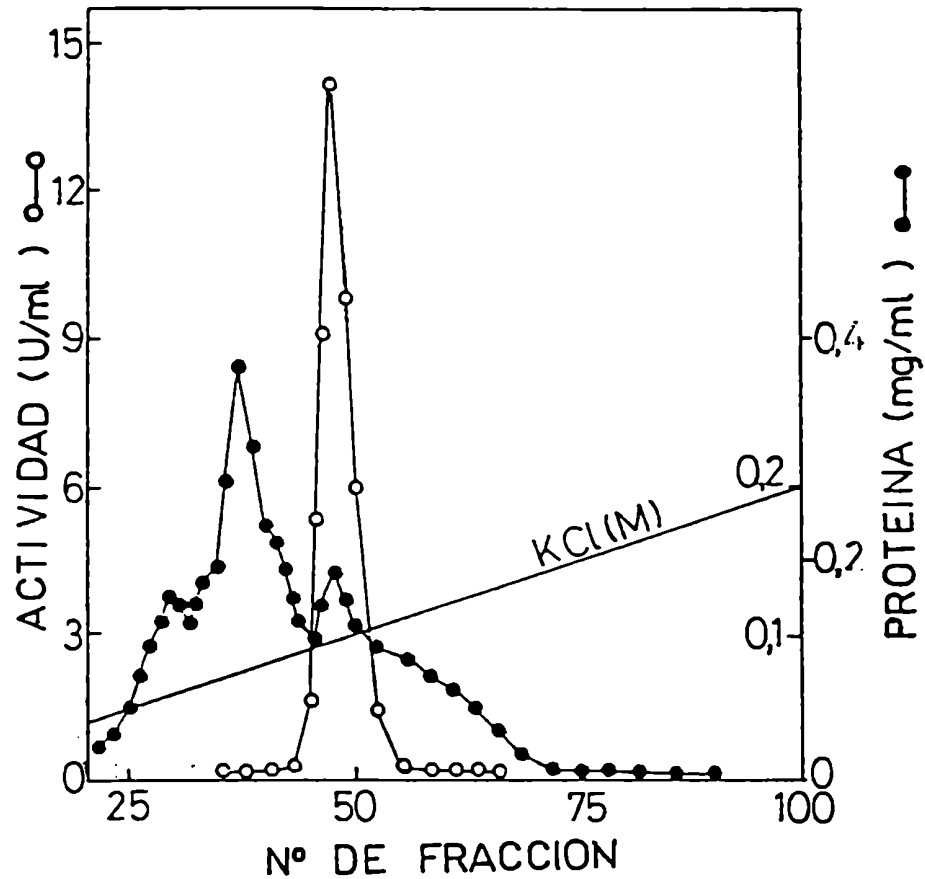


FIG.16: PERFIL CROMATOGRAFICO EN DEAE-CELULOSA.

La fracción proveniente de Sephacryl S-200 (15 μ g de proteínas) se sembró en una columna cuyas dimensiones y condiciones de elución se describen en Métodos. Se recogieron fracciones de 3 μ l y aquellas con mayor actividad específica (46-50) se concentraron.

Sin embargo, cuando la fracción proveniente de la precipitación salina (etapa 4) se dializó y sometió a una cromatografía similar, se observaron varios picos de actividad, como puede verse en la Fig.17, que eluyeron a concentraciones de KCl 65, 95, 120 y 145 mM; siendo el segundo pico, aunque variable en proporción de una preparación a otra, el que prevalece siempre en actividad. Estos resultados indican heterogeneidad de carga en la preparación enzimática menos purificada, lo cual podría ser explicado por la presencia de formas moleculares múltiples como se informó para la enzima eritrocitaria humana y bovina y la de linfoblastos e hígado humanos (329-331, 340) o por modificación proteolítica como han sugerido otros autores (332, 337).

Con la intención de investigar esta segunda posibilidad, se realizaron purificaciones en presencia de inhibidores de proteasas. Cuando se utilizaron 0,1 mM de PMSF y 3 µg/ml de aprotinina en las soluciones de homogeneización y a través de las etapas de purificación, se obtuvieron resultados similares para ambas preparaciones enzimáticas. Estos hallazgos permitirían descartar un efecto de proteólisis y sugerir que durante el proceso de purificación las formas cargadas, que aparecen minoritariamente en la distribución de la actividad, no se recuperan, o bien en ausencia de sustrato, se interconvierten especialmente hacia una forma única.

III.1.1.1 Pureza y estabilidad

La pureza de la PBG-D de hígado de rata se estableció de acuerdo a dos criterios diferentes:

a) Mediante el análisis electroforético de la enzima nativa a pH 8,9 como se indicó la sección II.2.4.1. En estas condiciones se observó una única banda de proteína que se correspondió con la de actividad enzimática, como se ilustra en la Fig.18a. Estos resultados fueron confirmados cuando se

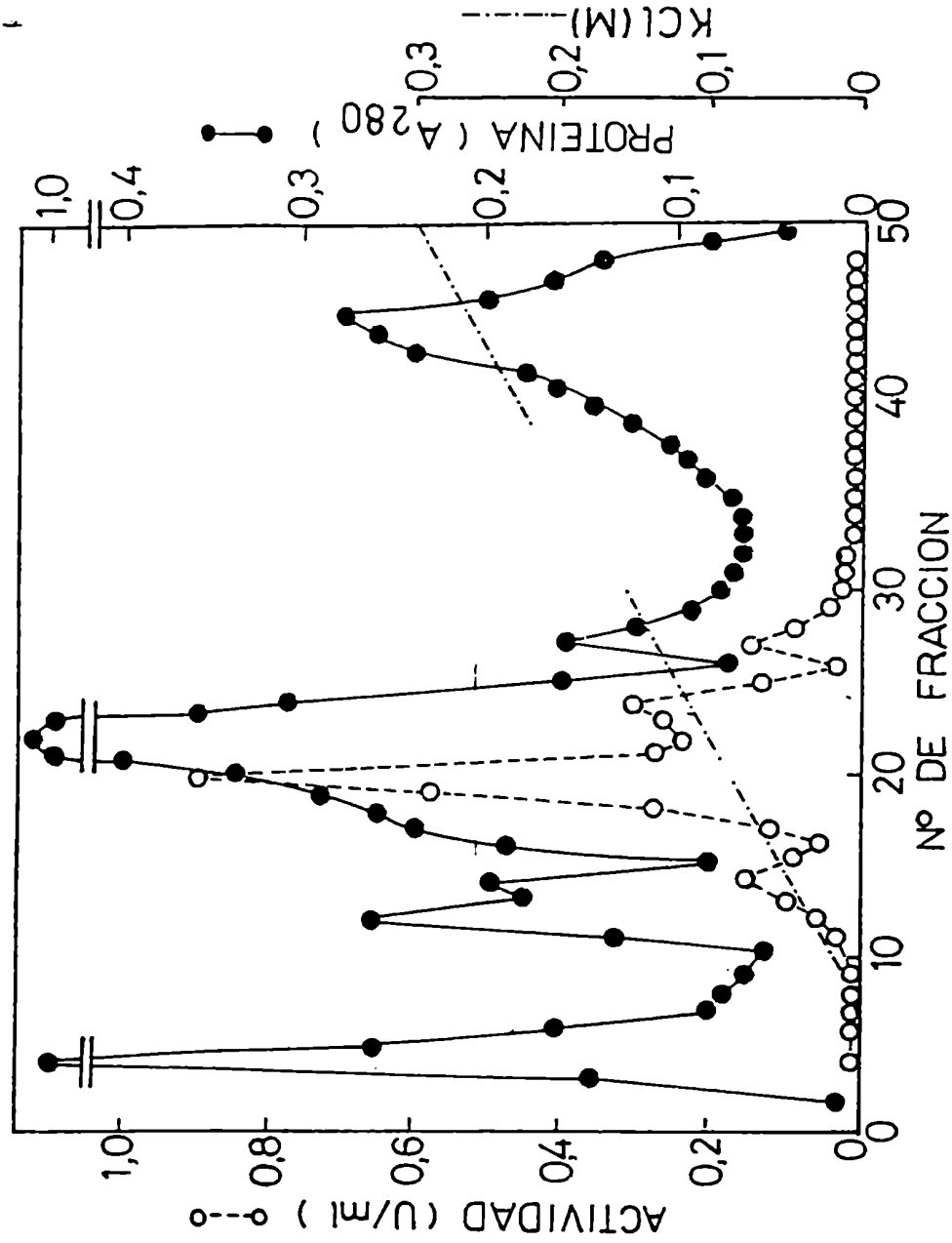


FIG. 17: PERFIL CROMATOGRÁFICO EN DEAE-CELULOSA DESPUÉS DE LA PRECIPITACION SALINA.

Una fracción proveniente de la precipitación salina (70 mg de proteínas) se dializó y sembró en una columna (2 x 22 cm) equilibrada con buffer A. La elución se realizó con un gradiente de KCl 0-0,3 M en el buffer de equilibrio. Se recolectaron fracciones de 7,5 ml a un flujo de 50 ml/h. Se midieron proteínas y actividad según se describe en Métodos.

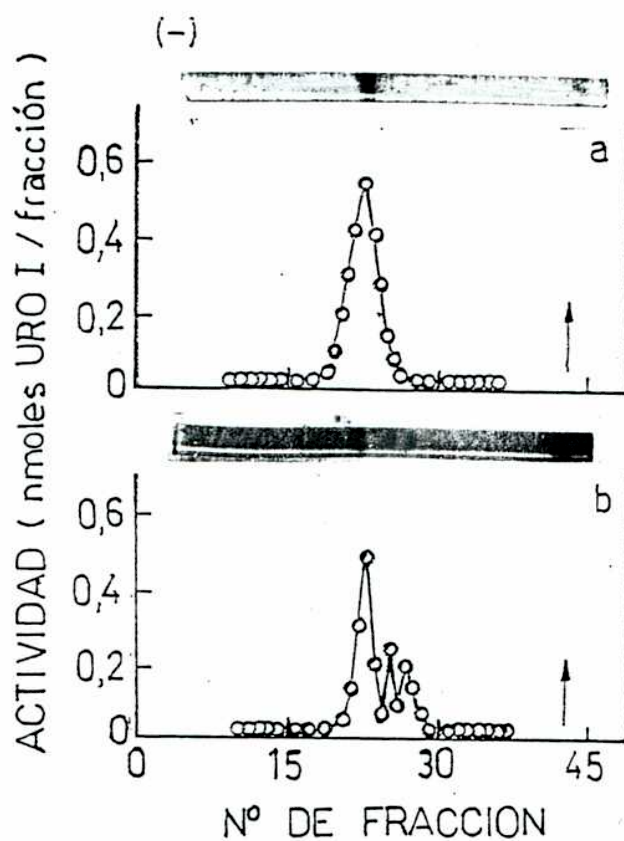


FIG. 18: ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES.

a) 60 μ g de proteína purificada se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (7,5 % T). La actividad enzimática y la tinción de proteínas se realizaron según se indica en Métodos. b) 60 μ g de proteína se incubaron a 37°C durante 10 min. con PBG 0,2 μ M. La muestra se sembró y corrió en iguales condiciones que en a). La posición del azul de bromofenol se indica mediante flechas.

realizaron corridas electroforéticas en condiciones desnaturalizantes, en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol y cuyo análisis se realiza en la sección II.1.2.1. No obstante, cuando la enzima pura se preincubó con su sustrato, PBG a tiempos (5-10 min) y concentraciones diferentes (0,1-0,2 mM) los perfiles de las electroforesis mostraron otras dos bandas de actividad más anódicas. Estas bandas coincidieron con los respectivos componentes proteicos como puede verse en la Fig.18b.

b) Mediante análisis inmunológicos según se describió en Métodos (sección II.2.9.2). Los anticuerpos de conejo obtenidos contra PBG-D hepática de rata enfrentados contra fracciones crudas y puras de la enzima mostraron una única banda de precipitación. Como se muestra en la Fig.19, aparece un solo arco de identidad entre ambas fracciones. Estos resultados indican la ausencia de otras proteínas antigénicas en la enzima purificada.

La PBG-D pura, en concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$ mantuvo su actividad por no más de 6 horas en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5 a temperatura ambiente, para decaer muy rápidamente y alcanzar valores de inactivación del 60% en 24 hs. Por otra parte el congelamiento a -20°C no previno en forma significativa este efecto, lo que indica que es una proteína lábil en soluciones diluidas. La estabilidad del sobrenadante del calentamiento y de la fracción 35-60% de saturación de sulfato de amonio fue de seis meses conservados a -20°C .

III.1.1.2 Caracterización

III.1.1.2.1 Parámetros moleculares e hidrodinámicos

Con el objeto de caracterizar a la enzima hepática de rata se iniciaron estudios de sus propiedades moleculares.

Se determinó el peso molecular aparente para la enzima

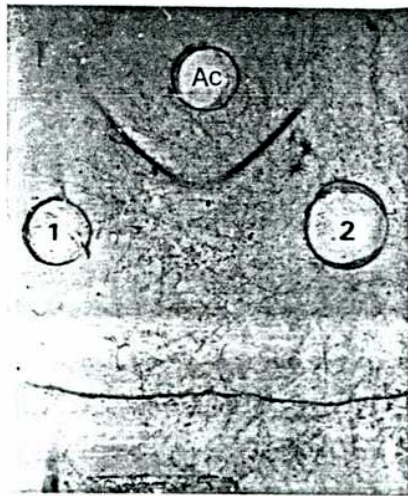


FIG.19: INMUNODIFUSION DE OUCHTERLONY.

Fracciones proteicas correspondientes a diferentes etapas del esquema de purificación se enfrentaron contra el anticuerpo anti-PBG-D de rata (Ac). 1) 50 μ U de la fracción correspondiente al sobrenadante del calentamiento; 2) 50 μ U de la fracción proteica homogénea.

nativa por tamizaje molecular utilizando una columna de Sephadex G-100, y diferentes proteínas marcadoras según se describió en la sección II.2.5.2. En la Fig.20a se muestra la posición de los marcadores y de la PBG-D para la cual se estimó un valor de 41.000 ± 3.000 Da. Para confirmar este dato se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. La Fig.20b muestra una corrida electroforética en condiciones desnaturalizantes de la enzima purificada y de los marcadores utilizados, así como el gráfico que representa la relación entre PM y la movilidad relativa de las proteínas respectivas. Como puede verse en la figura, se detectó una única banda proteica con movilidad intermedia respecto de los marcadores ovoalbúmina y tripsinógeno correspondiéndole en el gráfico un PM de 42.000, valor muy cercano al informado para la enzima de otras fuentes; lo señalado confirma la pureza de la preparación enzimática, así como la propiedad de ser una proteína monomérica.

Para el cálculo de los parámetros moleculares e hidrodinámicos se utilizaron los datos de los coeficientes de sedimentación y radio de Stokes obtenidos por estudios de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa y filtración en geles, respectivamente.

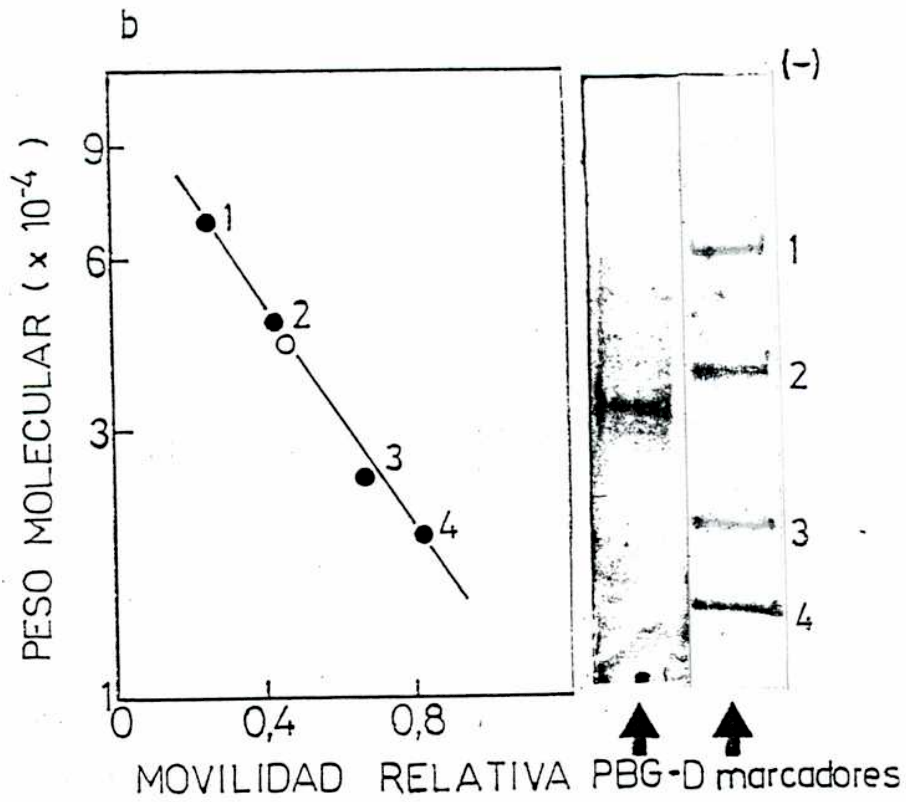
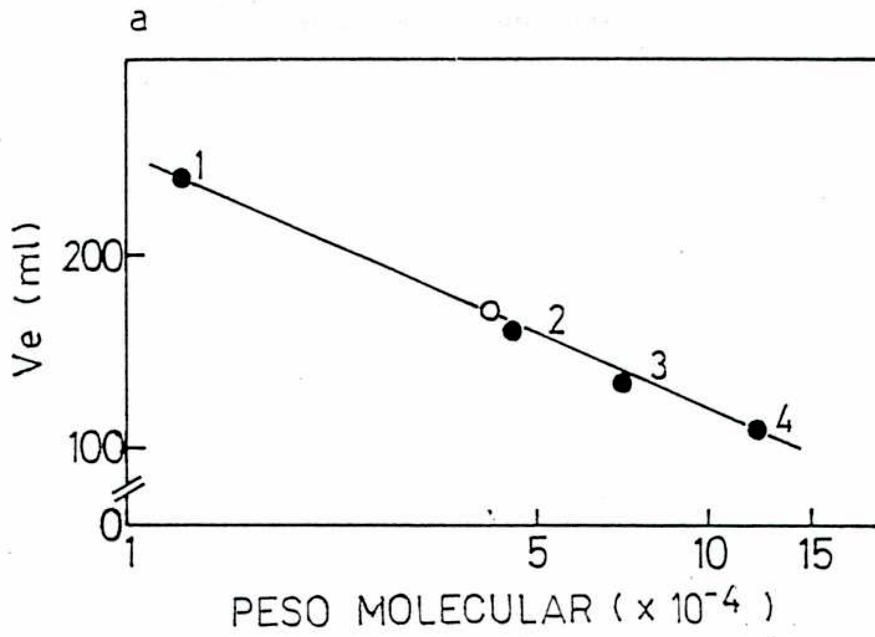
En la Fig.21 se muestra el perfil de actividad de PBG-D, así como la posición de las proteínas marcadoras de $s_{20,w}$ indicadas con flechas. Como puede observarse, la actividad se recuperó en un único pico, que eluyó muy cercano al marcador peroxidasa. El inserto en la figura muestra la relación lineal entre la distancia recorrida por las proteínas desde el menisco del gradiente hacia el fondo en función de sus respectivos $s_{20,w}$. El coeficiente de sedimentación para la enzima pura se obtuvo por interpolación en la recta obtenida, correspondiéndole un valor de 3,5 S.

El radio de Stokes de la enzima nativa se determinó analizando los datos de elución de la columna de Sephadex G-100

FIG.20: DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR.

a) PM de la proteína nativa por filtración por gel, 3 µg de PBG-D purificada y 5 µg de cada una de las proteínas marcadoras de peso molecular se sembraron en una columna de Sephadex G-100 (2,5 x 90 cm) equilibrada con buffer fosfato de sodio 0,1M, pH 7,5. La elución se realizó en el mismo buffer a un flujo de 35 ml/h. Se recogieron alícuotas de 4 ml. La determinación de los volúmenes de elución (V_e) de la PBG-D (○) y de las proteínas marcadoras (●) se realizó según se indica en Métodos. 1. citocromo C; 2. ovoalbúmina; 3. seroalbúmina bovina (monómero) y 4. seroalbúmina bovina (dímero)

b) PM mínimo por SDS-PAGE. La enzima (5 µg) y una mezcla de proteínas marcadoras (5 µg c/u) previamente desnaturalizadas se corrieron en gel plano (10% T) según se indicó en Métodos. La tinción se realizó con Azul Brillante de Coomassie R-250. La movilidad relativa a la del colorante indicador del frente de corrida se representa en función del PM de los marcadores (●). 1. seroalbúmina bovina (monómero); 2. ovoalbúmina; 3. Tripsinógeno y 4. β-lactoglobulina. PBG-D (○).



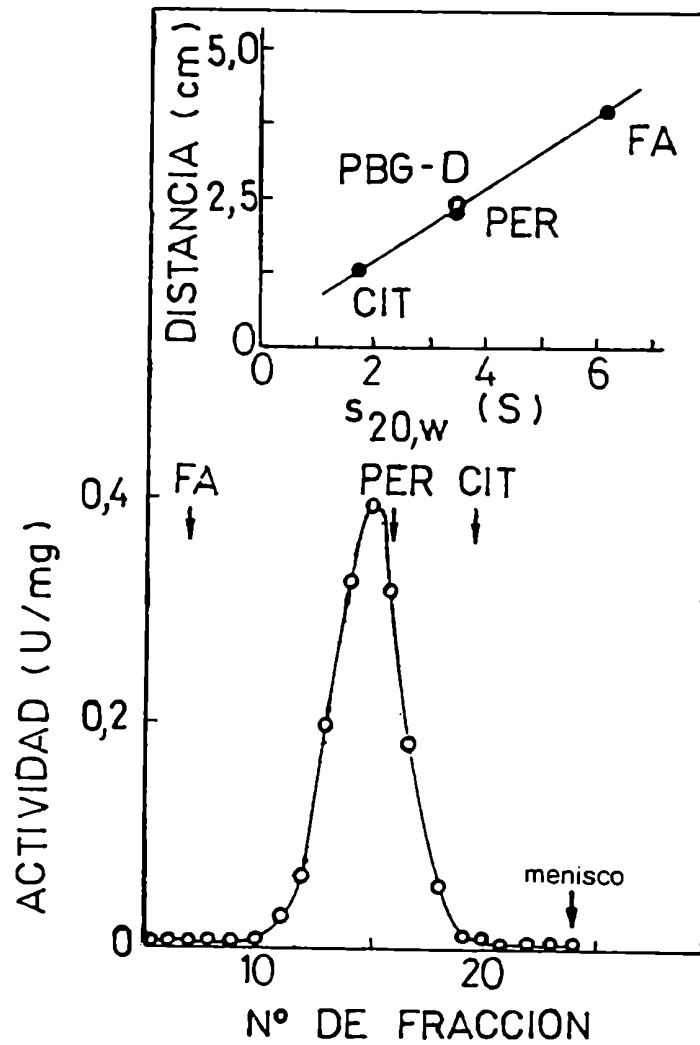


FIG.21: DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTACION.

En gradientes lineales de sacarosa, como se describe en Métodos, se sembraron 250 μ l de la fracción de Sephacryl S-200 conteniendo 150 μ g de proteínas junto con 25 μ l de la mezcla de marcadores de $s_{20,w}$. La determinación de la actividad enzimática (\circ) y de los marcadores en las alícuotas recogidas se describen en Métodos. Se usaron: peroxidasa (PER), fosfatasa alcalina (FA) y citocromo C (CIT), sus posiciones de elución desde el fondo del tubo son indicadas por flechas. Inserto: gráfico de la distancia recorrida por las proteínas (\bullet) versus $s_{20,w}$.

como se describió en Métodos. En la Fig.22 se muestran los perfiles proteicos de los marcadores de r_s y de actividad de la PBG-D purificada. El inserto en la Fig.22 muestra la relación entre $(-\log K_{av})^{1/2}$ y los r_s de las proteínas marcadoras. Por interpolación se obtuvo un valor del r_s de 27,0 Å para la enzima nativa.

Con los datos de $s_{20,w}$ y r_s obtenidos y combinados mediante la ecuación propuesta por Siegel y Monti (sección II.2.5.4) y considerando un volumen específico parcial de 0,725 cm³/g, semejante al de las proteínas globulares solubles, se pudo calcular el PM para la PBG-D, obteniéndose un valor de 41.600 Da.

Con los valores de PM y r_s así obtenidos se calculó el cociente friccional de la enzima aplicando la fórmula detallada en la sección II.2.5.5. Se estimó un valor de $f/f_0 = 1,18$ para la forma prolato hidratada.

Si se considera, además, la suposición de Neurath (483) referente a la influencia de la hidratación sobre la constante de disimetría, es decir que ésta se puede relacionar específicamente con la forma de la molécula proteica deshidratada, es posible calcular la relación de los ejes a (largo) y b (corto) = a/b para un elipsoide de revolución prolato y sus valores absolutos (a, b) por combinación de las ecuaciones para el cálculo del cociente friccional con la de Perrin (482) y la del volumen de dicho elipsoide. Mediante este análisis se obtuvieron valores de: 4 para la relación a/b y 115 Å y 20 Å para las dimensiones absolutas de los ejes a y b respectivamente.

Los estudios de isoelectroenfoque, en el rango 4-6,5, de muestras de la enzima correspondientes a homogenatos calentados a 55°C durante 5 min, revelaron la presencia de una o dos bandas a pH 4,8-4,9. Cuando se analizó por este método la enzima pura se detectó la presencia de dos bandas proteicas muy cercanas que fueron prácticamente indistinguibles cuando se

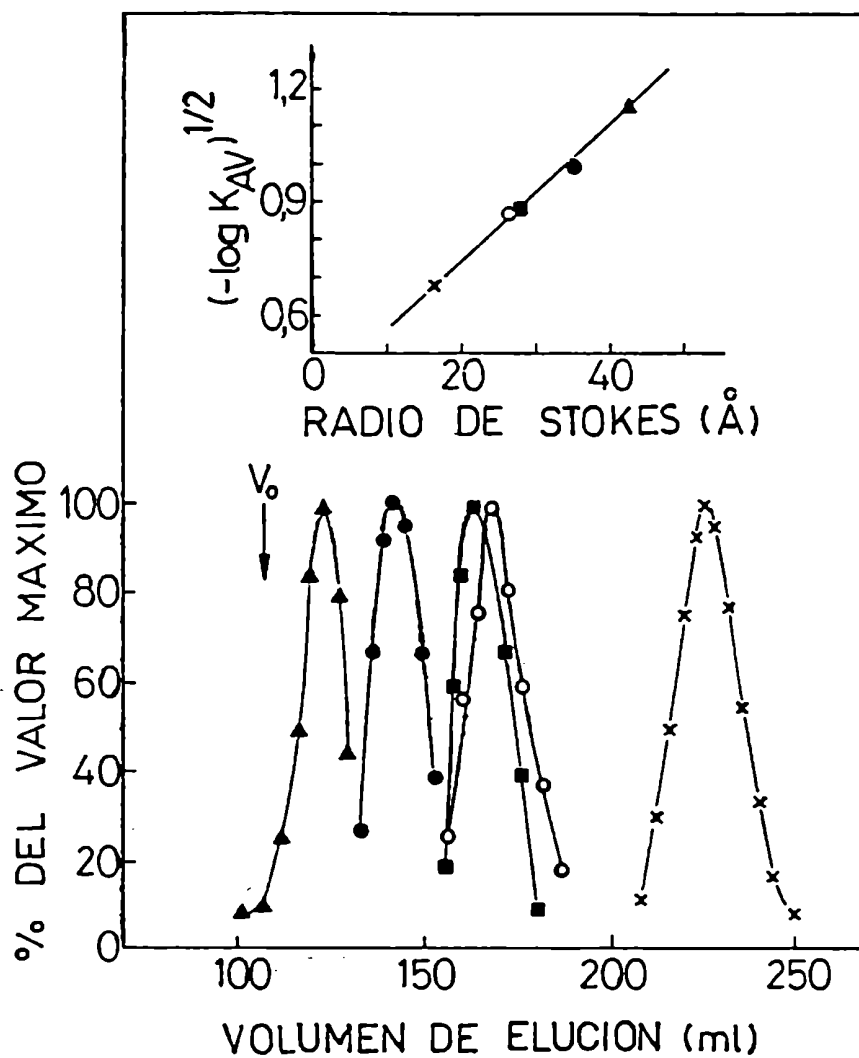


FIG.22: DETERMINACION DEL RADIO DE STOKES.

Se utilizaron los datos de elución de la columna de Sephadex G-100 de la Fig.20. La actividad de PBG-D (●) y la absorbancia de las proteínas patrones, indicadas en la figura como I respecto del valor máximo obtenido en cada caso, se determinaron según se indica en Métodos. Las proteínas marcadoras fueron seroalbumina bovina (dímero) (▲); seroalbumina bovina monómero (●); ovalbúmina (■) y citocromo C (x). Inserto: gráfico de $(-\log K_{AV})^{1/2}$ versus los radios de Stokes de las proteínas marcadoras según se detalla en Métodos. V_0 : volumen de exclusión.

determinó actividad enzimática y pH. La Fig.23 muestra la relación entre los valores de pH del gradiente obtenidos a partir de los pI de las proteínas marcadoras enfocadas y la distancia de las mismas al cátodo. De la representación lineal se obtuvo un valor de pI = 4,9 para la enzima pura. Estos resultados demuestran que la forma molecular predominante en tejido hepático es más ácida que las encontradas en eritrocitos de rata y de hígado humano, como se informa y discute más adelante (sección III.3.1).

III.1.1.2.2 Composición de aminoácidos

La Tabla II resume los resultados de la investigación de la composición de aminoácidos, considerando un PM de 42.000 para la enzima pura. El análisis de los mismos reveló una proporción relativamente alta, más del 40% de aminoácidos ácidos; la enzima contiene además una muy baja proporción de aminoácidos azufrados (metionina, cisteína y/o cistina).

Estos resultados son similares a aquellos obtenidos para la enzima eritrocitaria humana, pero diferentes especialmente en el contenido de residuos de tirosina (331).

III.1.1.2.3 Análisis espectral

El espectro de absorción (UV-visible) de la enzima pura en buffer fosfato 0,1 M a pH 7,5 mostró un típico perfil correspondiente al de una proteína libre (máximo 276-278 nm). Por lo tanto no hubo evidencias de cofactores u otros compuestos unidos a la enzima obtenida en estas condiciones; observándose además que aún la eventual presencia de isómeros de carga diferenciales no afectarían su perfil de absorción.

III.1.1.2.4 Análisis cinético

En las condiciones del ensayo estándar de medición de

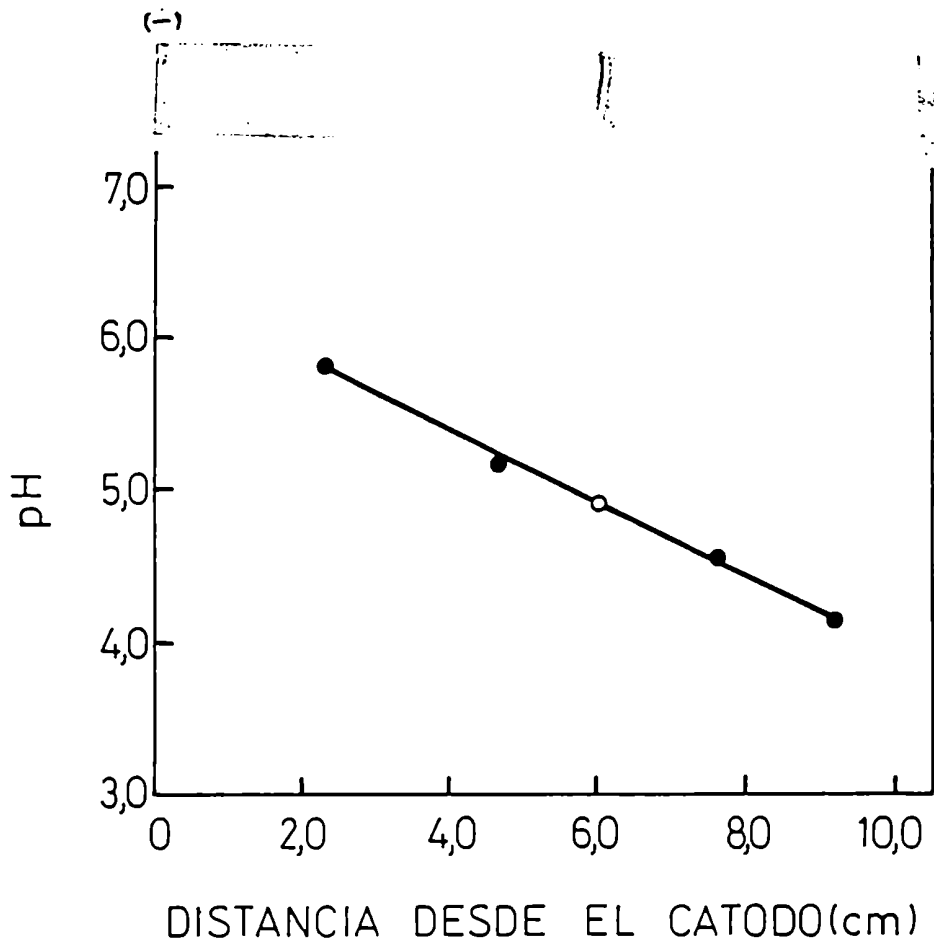


FIG.23: DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO.

La proteína purificada (2 μ g) y los marcadores (2 μ g c/u) se enfocaron en gel de agarosa con un gradiente de pH 4 - 6,5. La tinción de proteínas y la determinación de actividad de PBG-D se realizó según se especifica en Métodos. Las distancias al cátodo de los marcadores (●) se representaron en función de sus pI. 1. anhidrasa carbónica bovina B; 2. β -lactoglobulina A; 3. inhibidor de tripsina de soja; 4. glucosa oxidasa. En la parte superior de la figura se muestra el carril del gel teñido para proteínas correspondiente a la PBG-D (○).

TABLA II: COMPOSICION DE AMINOACIDOS

La determinación de la composición aminoacídica se realizó como se indica en Métodos. Los datos presentados son valores promedio obtenidos después de hidrólisis de 20 y 40 hs.

Aminoácido	Residuos * (moles)
Asx	41,7
Thr ^a	29,6
Ser ^a	33,2
Glx	59,2
Pro	18,6
Gly	41,8
Ala	30,6
Cys ^b	5,6
Val	20,6
Met	6,7
Ile	11,1
Leu	30,5
Tyr	9,7
Phe	12,8
Trp	N.D. ^c
Lys	18,8
His	8,4
Arg	14,5

* Residuos por 42.000 Da.

^a Valores obtenidos por extrapolación a tiempo cero de hidrólisis.

^b Medido como ácido cisteico después de la oxidación con ácido per fórmico.

^c N.D. no determinado.

actividad como se indicó en Métodos, la PBG-D hepática muestra una formación del producto, medido como URO I, que aumenta proporcionalmente con el tiempo y lo hace en forma lineal al menos por una hora, no observándose "lag". La cantidad de porfirinas formadas resultó además, proporcional a la concentración de enzima desde 0,03 a 0,7 nmoles de URO I/h a 37°C.

La Fig.24 muestra la dependencia hiperbólica de la actividad enzimática así como los resultados de aplicar el tratamiento de Lineweaver-Burk a los datos de velocidades iniciales en función de las distintas concentraciones de sustrato, confirmándose un típico comportamiento michaeliano de la enzima. Esto sugiere un mecanismo secuencial de desplazamiento en la unión de cada una de las cuatro moléculas de sustrato para dar el hidroximetilbilano. El valor de K_m obtenido fue de 17 μM a pH 7,5 en buffer fosfato de sodio 0,1 M y a 37°C. Este valor es algo mayor que el de la enzima de hígado bovino y eritrocitos humanos (120, 331).

En la Fig.25 se muestra la dependencia de la actividad enzimática medida como $V_{m\acute{a}x}$ con la variación del pH. El valor óptimo se encontró a pH 7,5 tanto en buffer fosfato 0,1 M como en Tris-HCl 0,05 M medido a la temperatura de incubación (37°C). Cabe señalar que la enzima mostró una actividad mayor en un 25% cuando se la probó en buffer Tris-HCl 0,1 M.

La proteína preincubada resultó estable en el rango de pH 6,0 - 8,0. Sin embargo, no pudo detectarse actividad cuando se incubó la enzima a pH menores a 6,2.

El tratamiento de los datos obtenidos en los estudios de dependencia de $V_{m\acute{a}x}$ versus pH permitieron obtener, tomando en consideración lo informado por Segel (495), dos valores de pK_a de 7,1 y 8,0. Sin embargo este análisis no puede distinguir entre los estados de ionización correspondientes a las especies involucradas en el o los complejos E-S.

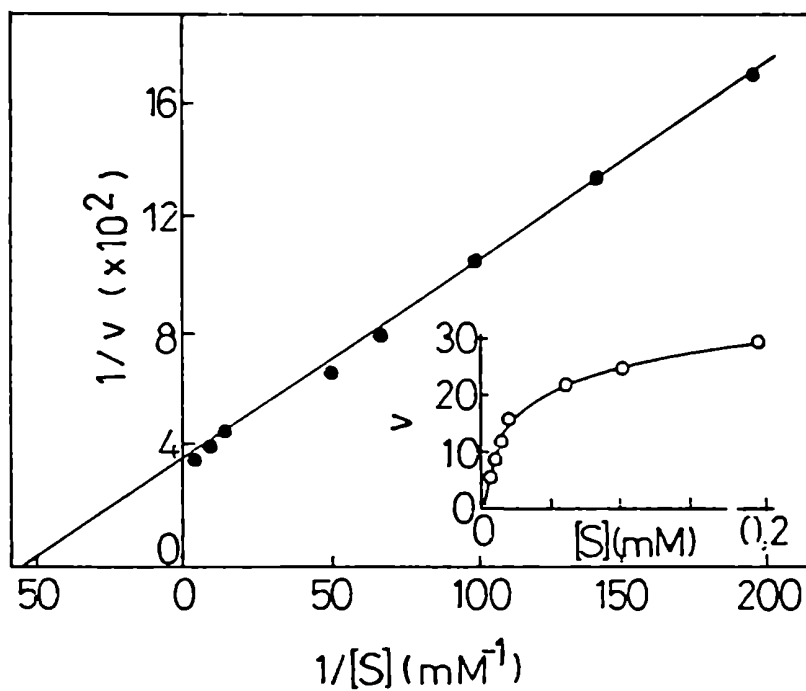


FIG.24: DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS. GRAFICO DE LINEWEAVER-BURK.

Las velocidades iniciales se determinaron midiendo la producción de URO I. Se utilizaron concentraciones de PB6 desde 5 a 200 μ M. Las unidades de v se expresan en nmoles de URO I/h.ug. Los valores representados son promedios de tres determinaciones.

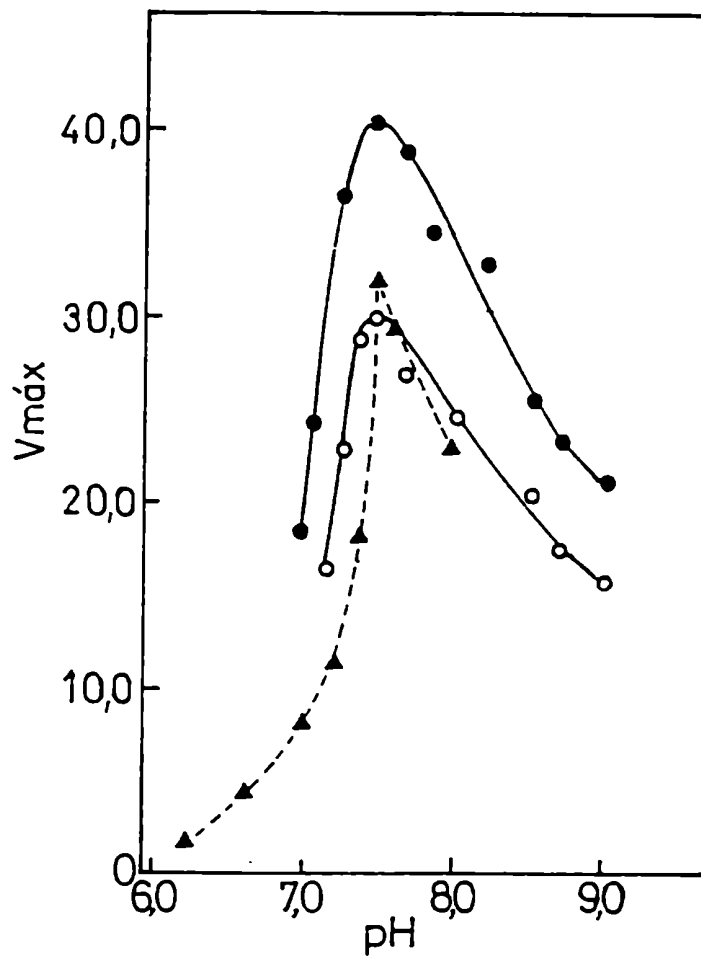


FIG.25: EFECTO DEL pH.

La actividad enzimática de la proteína purificada se determinó como se indica en Métodos. Los ensayos se realizaron a 37°C en los siguientes buffers: fosfato de sodio 0,1 M (▲), Tris-HCl 0,05 M (○) y Tris 0,1 M (●). Las unidades de V_{máx} se expresan en nmoles de URO l/h.og. Los valores indicados son promedios de tres experimentos.

Cuando se estudió la variación de la actividad de la PBG-D con la temperatura de incubación, se observó un aumento progresivo desde los 25°C, alcanzándose un máximo a valores cercanos a los 55°C. A estos valores de temperatura se observó un incremento de ocho veces la actividad respecto a la hallada a 37°C, mientras que a 25°C su capacidad catalítica disminuye a 0,4 veces y a 0°C es casi nula. Cabe destacar que a temperaturas mayores de 50°C la producción de porfirinas se incrementa notablemente a causa de la polimerización química del PBG-D, su sustrato específico. Por ende, los valores de actividad informados se hallan corregidos.

La magnitud del efecto de la temperatura puede ser evaluada, al menos en forma aproximada, mediante la aplicación de la ecuación de Arrhenius y el cálculo de la energía de activación (E_a), según se describió en la sección II.2.7, .

Este análisis permitió observar un comportamiento bifásico en el mecanismo de activación, con un corte a 45°C como se puede observar en la Fig.26, donde se grafica el log de la velocidad de reacción en función de la inversa de la temperatura absoluta. Estos resultados indicarían que podría tener lugar un cambio conformacional de la enzima, a esa temperatura, favoreciendo la reacción. A través de la relación lineal se estimaron los valores de E_a siendo de 62,8 kJ/mol para el rango 25-45°C y de 108,8 kJ/mol para el rango 45-55°C.

A temperaturas mayores a 55-60°C prevaleció el efecto de inactivación enzimática, observándose precipitación proteica.

El factor de temperatura Q_{10} , que indica el incremento de la velocidad de reacción con un aumento de la temperatura de 10°C varió entre 2 y 4 para el rango ensayado.

Los estudios de estabilidad térmica se llevaron a cabo preincubando la enzima en ausencia de PBG durante diferentes períodos de tiempo a las temperaturas indicadas en la Fig.27. Los resultados revelaron que la enzima de hígado de rata es muy

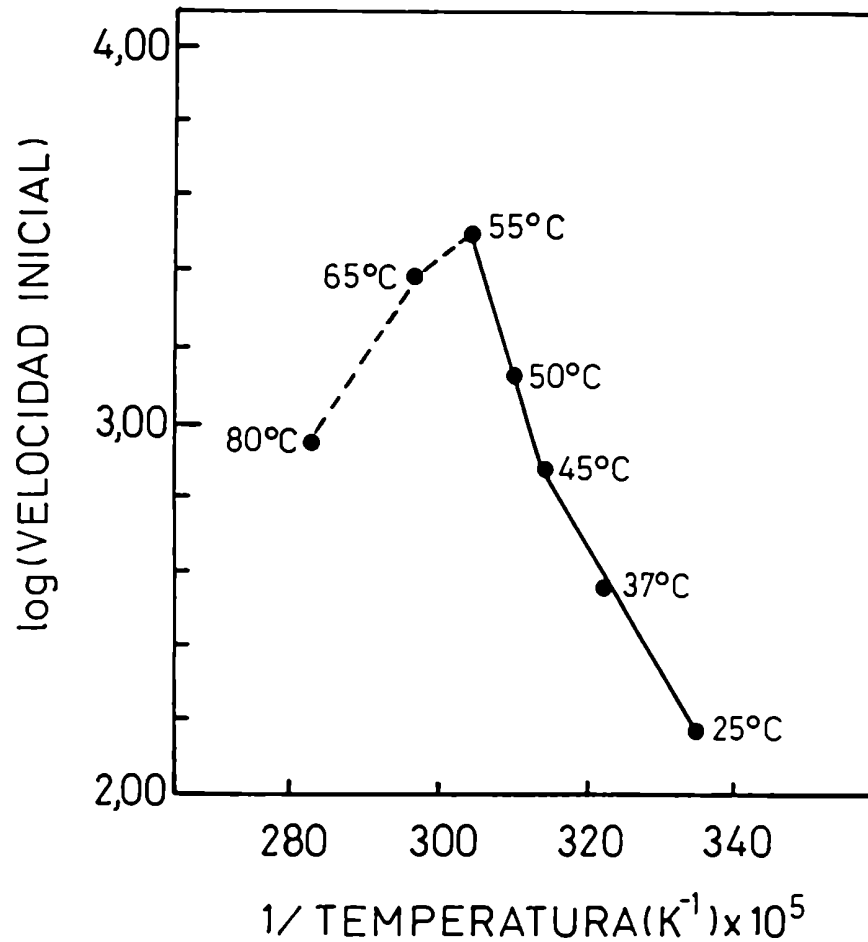


FIG. 26: EFECTO DE LA TEMPERATURA. GRAFICO DE ARRHENIUS.

La actividad enzimática se midió como se describe en Métodos, incubando la enzima con sustrato a las temperaturas indicadas. Se determinaron siempre velocidades iniciales cuyas unidades se expresan en moles de URO l/h.mg. Su valor a 37°C para la fracción correspondiente a la etapa de precipitación salina, fue de 360 moles de URO l/h.mg. Los resultados representan los promedios de tres determinaciones.

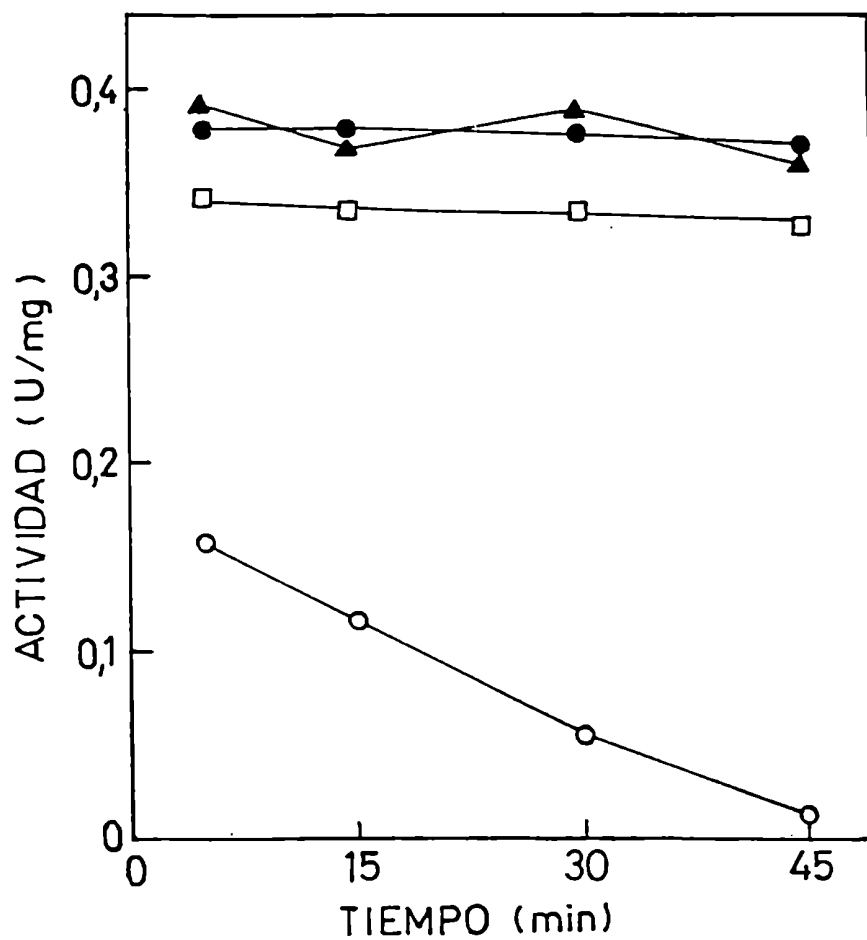


FIG.27: INACTIVACION TERMICA DE LA PB6-D.

Alícuotas de la enzima (25 μ l) correspondientes a la etapa de purificación de precipitación salina (0,38 U/mg) se preincubaron a 37°C (●), 45°C (▲), 65°C (◻) y 80°C (○) durante los períodos de tiempo indicados. La actividad residual se ensayó a 37°C como se indica en Métodos.

estable, ya que no se observó pérdida de actividad apreciable después de 45 min de preincubación a 45°C ó 55°C.

Cuando las temperaturas de tratamiento fueron mayores (80°C) se observó una pérdida progresiva de la actividad con el tiempo, sin embargo aún después de 30 min a 80°C la enzima retuvo un 15% de la actividad a 37°C.

III.1.2 ENZIMA DE HIGADO HUMANO

III.1.2.1 Aislamiento: Eliminación de la contaminación eritrocitaria

Como el objetivo primordial de esta investigación es el estudio de la PBG-D hepática humana, enzima que condiciona el establecimiento del síndrome porfírico en la enfermedad PAI, se hizo necesario contar con la proteína pura, es decir libre de su posible contaminación con isoenzimas provenientes de otros tejidos y en cantidades que permitieron su caracterización tanto biológica como estructural.

El hígado humano es un órgano ricamente vascularizado, recibe sangre por dos sistemas de vasos -vena porta y arteria hepática- que transportan alrededor de 1.500 ml de sangre por minuto. La circulación intrahepática es además extremadamente compleja. Este hecho, así como el material del cual se parte determinó que se intentaran diferentes estrategias, que tomaran como premisa la obtención de tejido hepático o hepatocitos libres de contaminación sanguínea.

El desarrollo de métodos para disgregar el tejido hepático, en particular de rata, en una suspensión de simples células viables, ha sido un logro tecnológico ampliamente satisfecho. Se han descrito una diversidad de ellos (496) y en todos los casos la integridad morfológica de la célula y su funcionalidad invariante han sido los requisitos deseables. Si bien el método de perfusión con colagenasa (497) es el más frecuentemente

empleado para la dispersión de las células y con un buen rendimiento de células parenquimatosas viables, para ciertos estudios su uso está limitado, por su costo y accesibilidad, sólo a animales o trozos de hígado pequeños. En nuestros estudios, sin embargo, el aislamiento de la enzima citosólica PBG-D de hígado humano para su posterior análisis requería un procedimiento que permitiera económicamente trabajar grandes cantidades de tejido -órdenes de cientos de gramos- y que eliminara la mayor cantidad de tejido sanguíneo que lo contamina. De hecho, el tejido fuente de la enzima proveniente de hepatectomías, biopsias o de autopsias, descartaba el uso de perfusión.

Para ello, se probó una técnica de disgregación mecánica y una posterior centrifugación diferencial, que permitió lograr el aislamiento de la PBG-D propia del hepatocito en cantidades que dependen del material de partida.

La Fig.28 muestra el esquema de la secuencia de operaciones descritas en Métodos (sección II.2.3.2.1).

La observación al microscopio óptico (100 x) de cada una de las fracciones obtenidas por esta metodología mostró que:

a) La fracción FI contenía conglomerados de células hepáticas agrupadas (racimos), pocas células aisladas, componentes subcelulares citoplasmáticos y eritrocitos.

b) En la fracción Sn₁ no se observó ningún tipo de células, se visualizaron sólo componentes subcelulares: mitocondrias, retículo endoplásmico, etc., producto de la ruptura de las mismas.

c) La fracción Sn₂ contenía casi exclusivamente glóbulos rojos intactos.

d) El precipitado final (Pdo₃) exhibía sólo células hepáticas agrupadas, escasos eritrocitos, algunos hepatocitos aislados y restos celulares. La morfología de las células hepáticas observadas no fue homogénea, lo que implicaría su ruptura por la técnica utilizada.

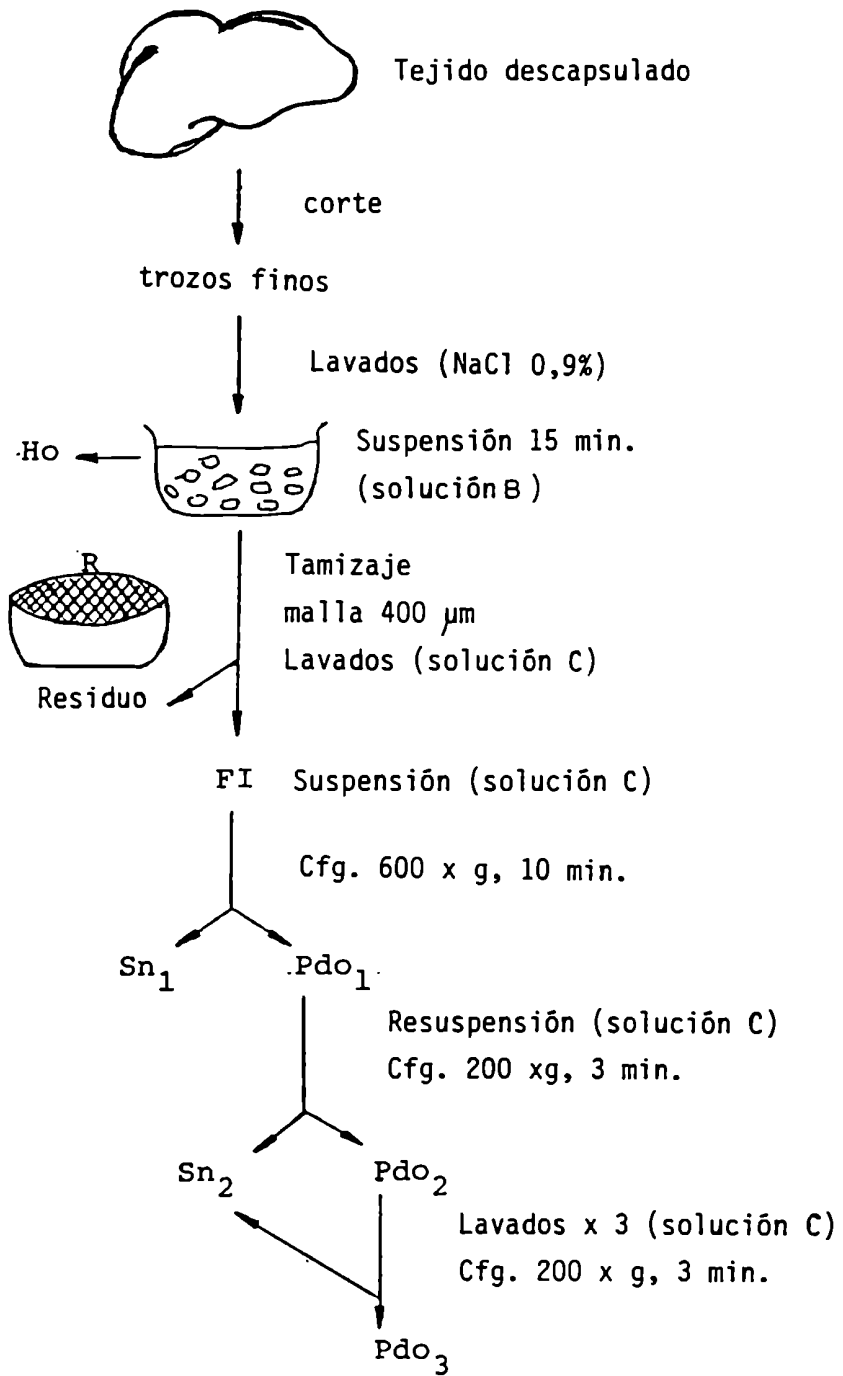


FIG.28: AISLAMIENTO DE LA PBG-D HEPATICA HUMANA.

Los detalles de cada una de las operaciones se indican en Métodos. Ho: homogenato; R: residuo; FI: fracción inicial; Sn: sobrenadante; solución B: sacarosa 0,25 M, EDTA 5 mM; solución C: sacarosa 0,25 M, EDTA 5mM, PMSF 0,1 mM.

En las distintas fracciones obtenidas (Fig.28) se midieron la actividad catalítica de PBG-D, proteínas totales y contenido de hemoglobina, según se indicó en Métodos, después de homogeneizar las suspensiones y los precipitados o lisar la fracción Sn₂ mediante congelamiento y descongelamiento sucesivos.

En la Tabla III se presentan los resultados de la cuantificación de la actividad enzimática y los porcentajes de su recuperación en las diferentes fracciones respecto de la suspensión inicial. Los mismos son representativos del procedimiento, aplicado en este caso a material proveniente de una hepatectomía (150 g de tejido).

La mayor cantidad de actividad catalítica de la enzima citosólica (76%) se recuperó en el primer sobrenadante después del tamizado de los cortes de tejido (Sn₁) lo que implica que la metodología aplicada produjo una gran ruptura de las células hepáticas y la salida de sus componentes citoplasmáticos. La actividad determinada en el sobrenadante Sn₂ corresponde a la de la isoenzima presente en los glóbulos rojos, que conforman esa fracción según lo demostró la observación microscópica. Sólo un 2% de la actividad quedó retenida en el precipitado, observándose una pérdida de la actividad total de un 7%.

TABLA III: ACTIVIDAD DE PBG-D EN LAS DIFERENTES FRACCIONES

Fracción	Actividad total (U)*	Recuperación (%)
FI	328	100
Sn ₁	248	76
Sn ₂	50	15
Pdo ₃	8	2

* U=naol URO I/h.

En la tabla IV se muestran los valores representativos de proteínas totales, contenido de Hb y el porcentaje de recuperación de esta proteína evaluados en cada una de las fracciones descriptas en la Tabla III.

TABLA IV: CONTENIDO DE PROTEINAS Y HEMOGLOBINA EN LAS DIFERENTES FRACCIONES

Fracción	Prot. Totales (mg)	Hemoglobina (mg)	Recuperación de Hb (%)
FI	9718	658	100
Sn ₁	6396	91	14
Sn ₂	600	524	80
Pdo ₃	2395	15	2

En la Tabla V figuran los resultados de la aplicación de esta técnica separativa cuando se utilizaron, como material de partida, muestras de tejido hepático obtenidas en diferentes condiciones y se midieron los parámetros de actividad y contenido de Hb en la fracción Sn₁.

Los valores de actividad enzimática y contenido de hemoglobina, expresados como porcentaje de recuperación para la fracción Sn₁ respecto de la inicial (FI) fueron similares para biopsias y hepatectomías. Se recuperó siempre un 75% o más de la actividad catalítica. En tejido "post-mortem", si bien la recuperación de la actividad enzimática fue de alrededor del 80%, la contaminación eritrocitaria resultó siempre significativamente mayor que la obtenida en hepatectomías y biopsias cuando se aplicó el test de Many-Whitney para muestras independientes (498).

TABLA V: RECUPERACION DE ACTIVIDAD ENZIMATICA Y DE CONTENIDO DE HEMOGLOBINA

Los valores representan promedios y rangos porcentuales de las fracciones Sn_1 respecto de las FI para las diferentes muestras.

Fracción Sn_1	Actividad de PBG-D (%)	Hemoglobina (%)
Autopsias (n=9)	82 (80-83)	22 (20-25)
Biopsias (n=7)	76 (70-78)	13 * (9-15)
Hepatectomías (n=4)	75 (69-77)	14 ** (10-17)

* $p < 0,025$

** $p < 0,05$

Por otra parte, si los valores de actividad de PBG-D de las fracciones Sn_1 se consideran respecto de la actividad de las fracciones iniciales pero corregidas por la contribución de las correspondientes eritrocitarias (FI- Sn_2) se obtienen porcentajes de recuperación significativamente más altos, igualándose los valores para hepatectomías y autopsias, (autopsias: 89%, biopsias: 86% y hepatectomías: 89%). Cabe aclarar que la contribución de la isoenzima eritrocitaria como contaminación inicial depende de la lisis producida en el material de partida, que en el caso de autopsias puede ser elevado.

En estos ensayos el rendimiento de las unidades enzimáticas obtenidas respecto del peso de hígado trabajado (U/g tejido húmedo) fue muy variable, dependiendo especialmente de la consistencia y edad del material de partida. Se pudo observar

que una vez tamizados los cortes de tejidos, los pesos de los residuos (R) resultaban significativamente diferentes. Sus valores variaron entre 30-60% del peso total inicial, por lo que todas las mediciones y cálculos se realizaron a partir de la etapa FI. En general, estos residuos fueron desechados ya que contenían gran cantidad de material conectivo, fibroso y vascular con sangre ocluida, además de acúmulos de tejido hepático. Ensayos para lograr una mayor recuperación del contenido celular de dichos acúmulos mediante un posterior procesamiento de los residuos con un tratamiento físico más forzado, significaron siempre una mayor contaminación con el contenido citosólico de otras células, en particular las eritrocitarias.

Se compararon además, las actividades del tejido hepático (hepatectomías) medidas en las suspensiones (Ho y FI) obtenidas por dos técnicas de tratamiento mecánico, previa descapsulación, lavado y corte del tejido similar para ambas, 1) homogeneización de los trozos con disgregador tipo Potter-Evelhjem, rutina en la determinación de enzimas (fracción Ho) y 2) filtración forzada a través de mallas de acero inoxidable (FI). Como puede verse en la Tabla VI los resultados muestran valores de actividad específica similares para ambas suspensiones, lo que implica que en el tratamiento se conserva dicha relación de actividad a proteína y a veces la favorece a expensas de proteínas contaminantes.

Por todo lo expuesto, este método, basándose esencialmente en procedimientos empleados para la obtención de suspensiones celulares hepáticas por métodos mecánicos, permitió la obtención del contenido citoplasmático de células del hígado humano con escasa contaminación de hemoglobina y por ende de proteínas del eritrocito en general y de la enzima PBG-D eritrocitaria en particular. La técnica se basa en la filtración forzada de trozos de hígado finamente cortados, a través de mallas de acero inoxidable. Se probaron tamices con

diversas aperturas de malla eligiéndose la de 400 μm que permitió la ruptura diferencial de las células que constituyen el tejido parenquimático del hígado (sistema continuo) y la filtración facilitada por el tamaño menor de las células sanguíneas (sistema discontinuo). El tratamiento mecánico daña así, la célula hepática, probablemente por abrasión de la membrana plasmática.

TABLA VI: ACTIVIDAD DE PGB-D EN HOMOGENATO Y FRACCION INICIAL

MUESTRA	FRACCION	ACT. ESPECIFICA (U*/mg proteína)
Adulto	Ho	0,024 \pm 0,003**
	FI	0,033 \pm 0,007**

* U = μmol de URO I/h, ** valor promedio \pm SD (n=12)

El análisis de los resultados presentados permite inferir que una masa considerable de tejido hepático se desintegró y que su contenido citoplasmático se liberó como se demuestra por la aparición de organelas propias del mismo en la fracción Sn_1 y por haberse determinado en ella la actividad de PGB-D.

Las Tablas III y IV demuestran que: a) la mayor proporción de la proteína enzimática (75-80%) aparece contenida en la fracción Sn_1 y una pequeña proporción distribuida en las otras fracciones; b) la actividad catalítica de Sn_1 corresponde principalmente a la isoenzima hepática, mientras que la de la fracción Sn_2 pertenece a la eritrocitaria; c) los eritrocitos que por su discontinuidad pasan sin ruptura a

través del tamiz de 400 μm , sedimentan en la primera centrifugación (Pdo_1) y posteriormente a su resuspensión, se localizan en la fracción Sn_2 por la subsiguiente centrifugación a menor velocidad y tiempo.

III.1.2.1.1 Actividad basal de PBG-D

Los niveles basales de PBG-D en tejido hepático adulto se midieron en los diferentes materiales de partida accesibles. El análisis de los resultados mostró valores promedios no significativamente diferentes. Se obtuvieron valores de 0,025; 0,024 y 0,028 U/mg proteína para homogenatos de biopsias, hepatectomías y autopsias, respectivamente. La actividad específica promedio medida después de la homogeneización del tejido con disgregador del tipo Potter Elvehjem (Ho) y después de la eliminación de la contaminación eritrocitaria (Sn_1), según el esquema descrito, se muestra en la Tabla VII.

TABLA VII: ACTIVIDAD BASAL EN DIFERENTE MATERIAL HEPATICO

MUESTRA	FRACCION	ACT. ESP. (U*/mg)
Adulto (Biopsia, autopsia, hepatectomía; n=30)	Ho	0,026 \pm 0,004 **
	Sn_1	0,039 \pm 0,003**
Neonato (Autopsia; n=3)	Ho	0,080

* U = naol de URO I/h, ** valor promedio \pm SD

Los valores promedio de actividad específica para Ho

estuvieron comprendidos dentro del rango 0,20 a 0,33 U/mg y los de S_{n1} entre 0,030 y 0,052 U/mg. Si se considera el valor promedio de proteínas obtenido en esta investigación de 148 mg/g de tejido húmedo, la actividad basal promedio de la enzima PBG-D en hígado adulto es de 3,66 U/g de tejido húmedo. Este valor, algo superior (27%) al informado por Strand y col. (391), confirma su baja actividad en hígado, de forma tal que puede ser considerada como la segunda enzima de velocidad limitante en el camino biosintético del hemo en este tejido. En hígado de neonato la actividad específica en la fracción H_0 resultó tres veces superior a la de tejido adulto, lo cual concuerda con la mayor actividad que esta enzima presenta en tejidos hematopoyéticos (229). Por ello, la mayor actividad observada puede atribuirse a que el hígado de neonato exhibe actividad eritropoyética residual.

III.1.2.2 Purificación.

Las muestras provenientes de hepatectomías, que se obtienen en condiciones de circulación restringida, presentan un menor contenido de glóbulos rojos y disminuyen la posibilidad de contaminación eritrocitaria, por lo que constituyen el material de elección para la purificación de la enzima.

La fracción S_{n1} obtenida a partir de este material y según el procedimiento descrito en la sección II.2.3.2.1 y esquema de la Fig.28 se utilizó como punto de partida del proceso de purificación.

En la Tabla VIII se presentan los resultados de una purificación representativa de PBG-D, según se detalló en Métodos (sección, II.2.3.2.2).

La actividad específica obtenida después del pasaje por una segunda columna de Sephadex G-75 es de 30,5 U/mg, con un rendimiento del 17% y un grado de purificación de 744 veces. Cabe destacar que su comparación se realiza con una etapa que

implicó previamente la ruptura del hepatocito, la liberación de las enzimas citoplasmáticas al medio de suspensión y una centrifugación que eliminó además de los restos celulares, la contaminación eritrocitaria.

TABLA VIII: PURIFICACION DE LA PBG-D DE HIGADO HUMANO^a

Los detalles experimentales de los pasos de purificación y la medición de actividad y proteínas se describen en Métodos.

Etapa	Proteínas (mg)	Act. Esp (U*/mg)	Purific.	Rto. (%)
1.Sn ₁	7.820	0,041	1	100
2.Sn 11.000xg	6.050	0,050	1,3	94
3.Calentamiento	1.126	0,249	6,1	87
4.Precipitación				
Salina	759	0,320	7,8	75
5.DEAE-celulosa	230	0,826	20,1	59
6.Phenyl Sepharosa	60	2,33	57	43,3
7.Sephadex G-100	12,3	6,67	163	25,4
8.DE-52	7,5	9,90	241	23,0
Pico A	2,4	13,30	324	9,9
Pico B	2,4	7,80	190	5,8
Pico C	2,5	8,80	215	6,8
9.1er.Sephadex G-75	2,1	28,5	695	18,6
10.2do.Sephadex g 75	1,8	30,5	740	17,1

^a A partir de 150 g de hígado.

* U = naol URO I/h.

El valor de la actividad específica, resulta comparable con el que informamos anteriormente para la de hígado de rata (36,2 U/mg) pero es mucho menor que los publicados para la de eritrocitos humanos (331) y bazo de rata tratada con fenil-hidracina (332). El análisis de estos resultados sugiere no sólomente variabilidad de especie, sino también variabilidad tisular.

Debe señalarse que para obtener proteína purificada en el orden de los miligramos, es necesario procesar cantidades de hígado del orden de 100 a 200 g, hecho éste que significó un obstáculo debido a la poca accesibilidad del material.

La etapa de calentamiento a 55-60°C permitió la separación de una gran cantidad de proteínas contaminantes, entre ellas la URO-CoS, con un elevado porcentaje de actividad recuperada (92%) convalidando nuevamente la termoestabilidad de esta proteína en todas las fuentes estudiadas.

En el fraccionamiento salino, la actividad de la proteína se recuperó en el rango 35-60% de saturación de sulfato de amonio, descartándose casi un 10% que precipitó entre el 0-35% de saturación por la baja actividad específica que se logra debido a que precipita una gran cantidad de otras proteínas. La interacción con la resina aniónica y su lavado a baja fuerza iónica favoreció la eliminación de la pequeña contaminación de hemoglobina que co-purifica hasta esta etapa.

La columna de Phenyl-Sepharosa presentó ciertos problemas para lograr la unión a la resina tanto de la enzima, en particular, como la de las restantes proteínas, en general. El primer intento consistió en equilibrar la resina con KCl 0,25 M en buffer D. La muestra proteica se sembró en la misma solución y se comprobó que la PBG-D percolaba junto con la mayoría de las proteínas presentes, durante el lavado de la columna realizado con dos volúmenes de la misma solución. Se decidió entonces, trabajar con una mayor fuerza iónica, mediante la adición de sulfato de amonio 1,2 M al buffer D, tanto para

equilibrar la resina como para la siembra de la muestra proteica, obteniéndose con este procedimiento resultados satisfactorios. La Fig.29 muestra el perfil de elución de la columna de Phenyl-Sepharosa. Como puede apreciarse, de los cinco picos proteicos, sólo uno, que eluyó con el buffer D (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,6) concentró la actividad enzimática con buena recuperación (75%). Cabe remarcar la alta fuerza iónica necesaria para su interacción con la resina de intercambio hidrofóbico y concomitantemente la muy baja fuerza iónica requerida para su elución.

En la Fig.30 se muestra el perfil de filtración típico de la actividad de deaminasa de la fracción anterior, cromatografiada en una columna de Sephadex G-100. Se obtuvo un sólo pico de actividad que eluyó después del pico mayor de proteínas. La purificación obtenida es de aproximadamente tres veces, sin embargo se produjo una pérdida apreciable de actividad (40%).

Generalmente, la cromatografía de intercambio iónico (DE-52) utilizada en el paso siguiente de purificación, resolvió la actividad enzimática retenida, en un máximo de tres picos (señalados como A,B y C en la Fig.31) con solapamiento de los mismos y que eluyeron a fuerza iónica creciente, correspondiente a concentraciones de 85, 95 y 105 mM de KCl respectivamente. Sin embargo, el número de picos con actividad catalítica (2 ó 3) y la distribución de la actividad total mostró, en ocasiones, variaciones dependiendo de la preparación analizada. La Fig.31 muestra un perfil de elución representativo de esta cromatografía y el análisis de sus resultados indica la existencia de formas de PBG-D heterogéneas en su carga, dato que se discutirá en términos del análisis de su estructura más adelante (sección III.3.1).

Las fracciones con mayor actividad específica se reunieron y concentraron. La muestra obtenida, sometida a una filtración molecular en una columna de Sephadex G-75, presentó un perfil

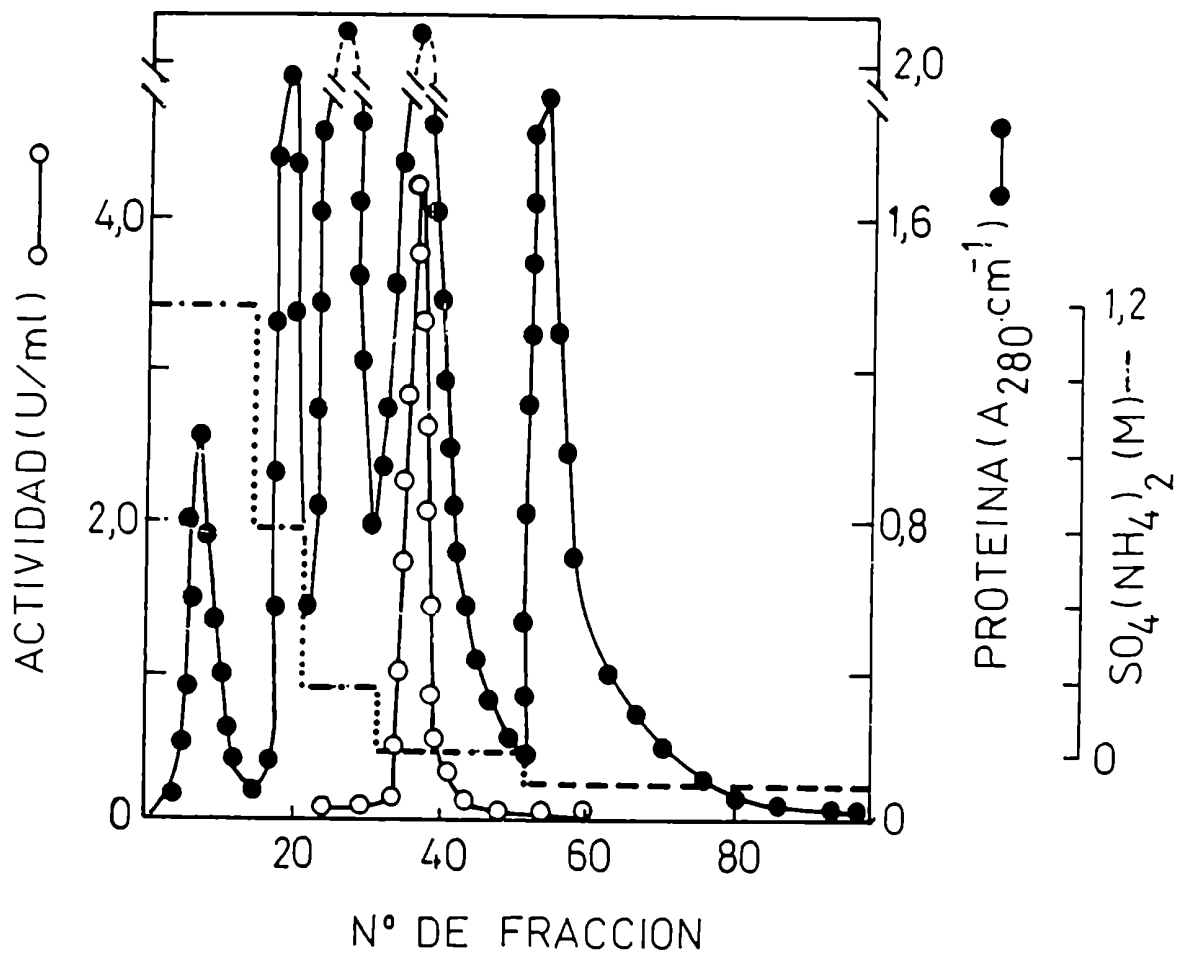


FIG.29: PERFIL DE LA COLUMNA DE PHENYL SEPHAROSA.

Se sembraron 230 mg de proteína correspondiente a la etapa 5 del esquema de purificación. La columna fue eluida a un flujo de 50 ml/h, recolectándose fracciones de 5 ml, con un gradiente discontinuo de sulfato de amonio en buffer D (→) y agua destilada llevada a pH 7,6 (---). Las determinaciones de actividad enzimática y proteínas se realizaron como se indica en Métodos.

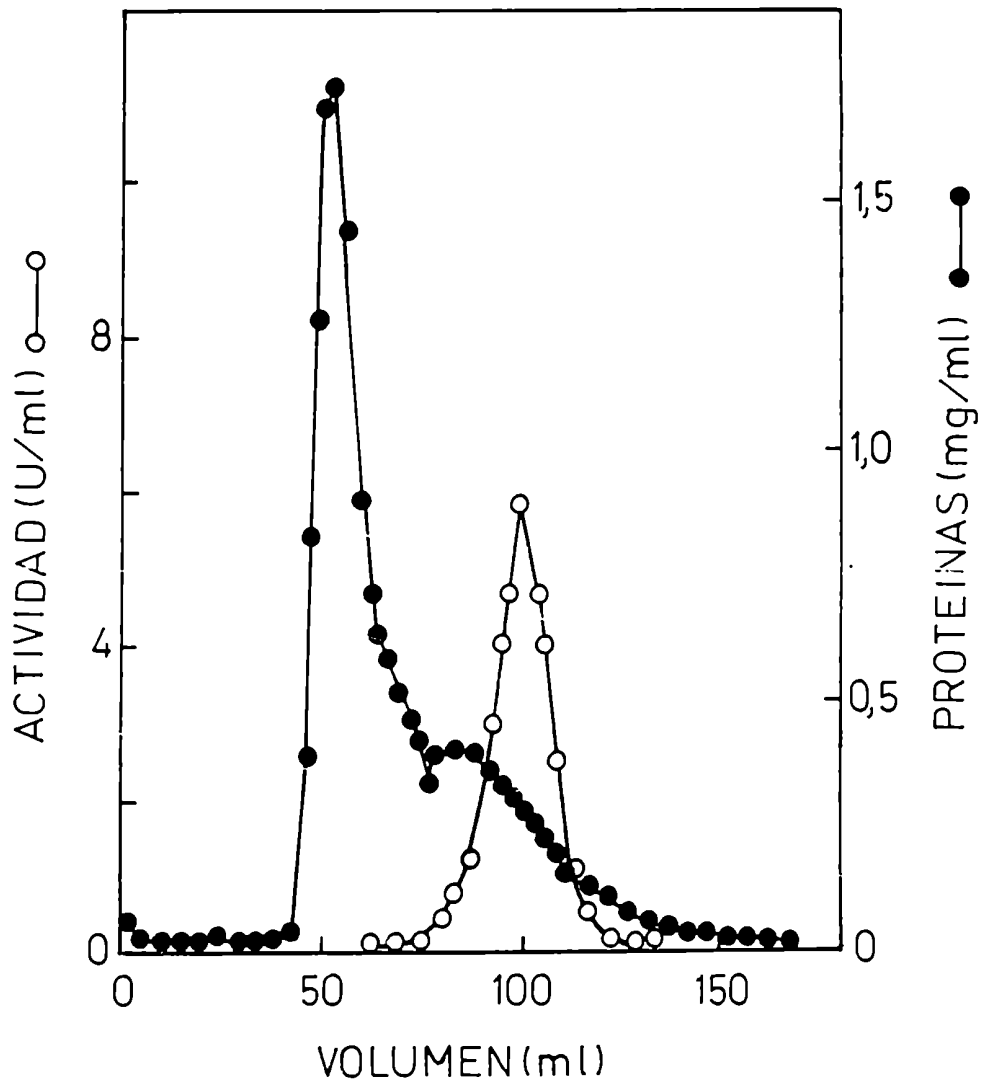


FIG.30: PERFIL DE ELUCION DE LA COLUMNA DE SEPHADEX 6-100.

Se sembraron 60 mg de proteína correspondientes a la etapa 6 del esquema de purificación. La columna se eluyó con buffer D, recolectándose fracciones de 3 ml en las que se dosaron actividad enzimática y proteínas de acuerdo a lo que se indica en Métodos.

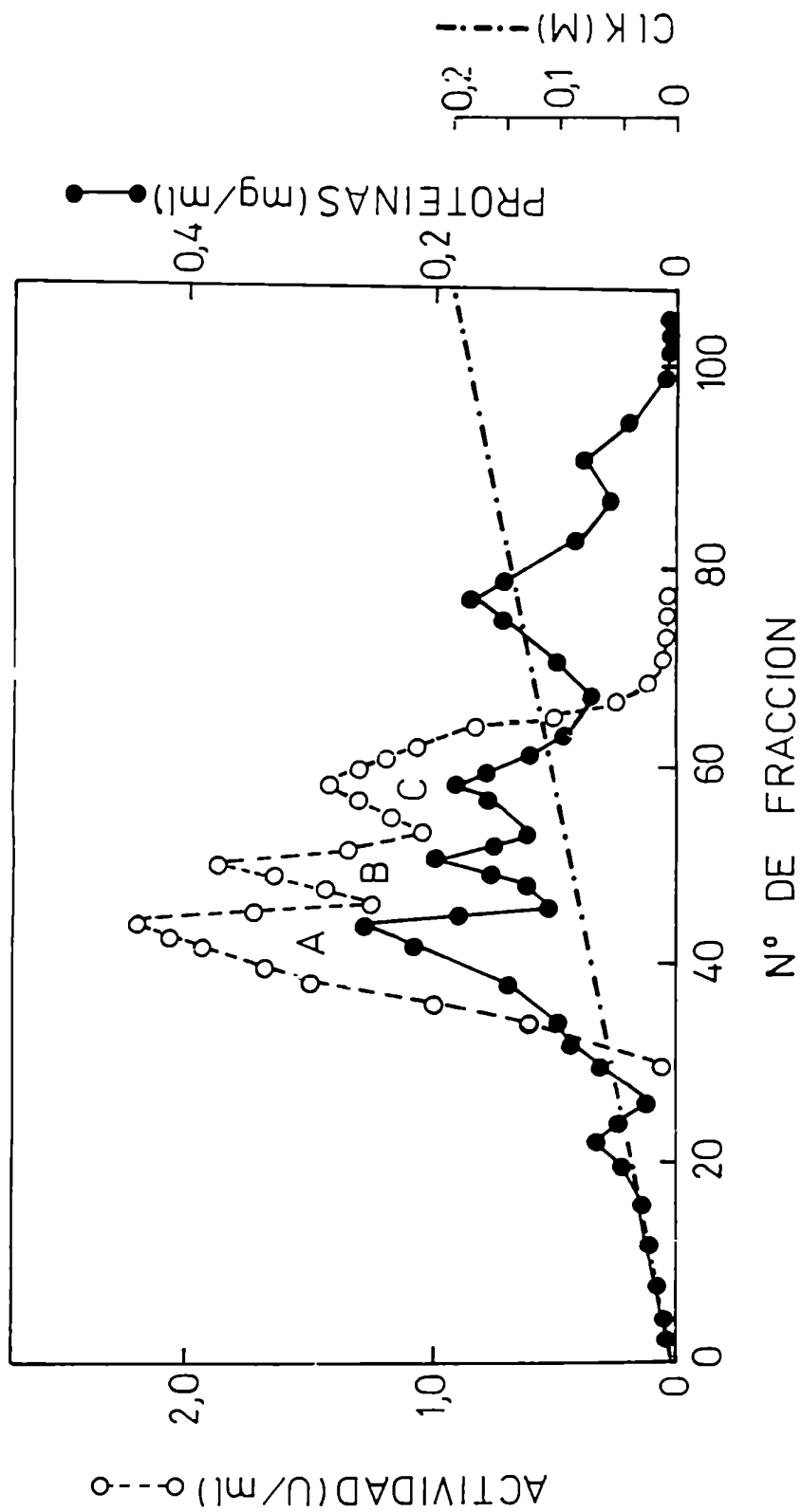


FIG. 31: PERFIL CROMATOGRAFICO DE LA COLUMNA DE-52.

Las condiciones de equilibrio, siembra y elución se indican en Métodos. Las fracciones recolectadas fueron de 2 ml, en ellas se midieron actividad enzimática y proteínas según se indica en Métodos. A, B, C: picos con actividad enzimática.

proteico que se indica en la Fig.32A, con un único pico de actividad enzimática, que se recromatografió en otra columna similar. Como puede verse en la Fig.32B sólo se obtuvo un único pico proteico simétrico y coincidente con el pico de actividad enzimática, lo que permitiría suponer que la proteína ha sido purificada a homogeneidad.

Los resultados obtenidos tanto en las diversas etapas de la purificación como los perfiles cromatográficos fueron siempre similares ya sea que el procedimiento se realizara en presencia o ausencia de inhibidores de proteasas.

Con el fin de verificar la pureza de la última fracción proteica, y realizar el seguimiento del esquema de purificación aplicado, se hicieron análisis electroforéticos en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes según se indicó en la sección II.2.4.2. La Fig.33 muestra una corrida electroforética de distintas fracciones, en la cual se detectó una única banda de proteína con movilidad algo menor al marcador ovoalbúmina (45 kDa) en el carril correspondiente al pico de elución de la última columna de Sephadex G-75.

III.1.2.3 Caracterización

III.1.2.3.1 Parámetros moleculares e hidrodinámicos

Con el objeto de realizar estudios comparativos tanto con la enzima eritrocitaria humana como con la de hígado de rata se llevaron a cabo una serie de investigaciones tendientes a caracterizar estructural y cinéticamente la proteína proveniente de tejido hepático humano.

La Fig.33 muestra la corrida electroforética en SDS-PAGE de la enzima purificada (carril 4 y 6) y de los marcadores utilizados. El análisis de las movilidades relativas permitió estimar para la PBG-D en estudio un peso molecular de 45.000.

Con el fin de asegurar este valor, se calculó el FM según

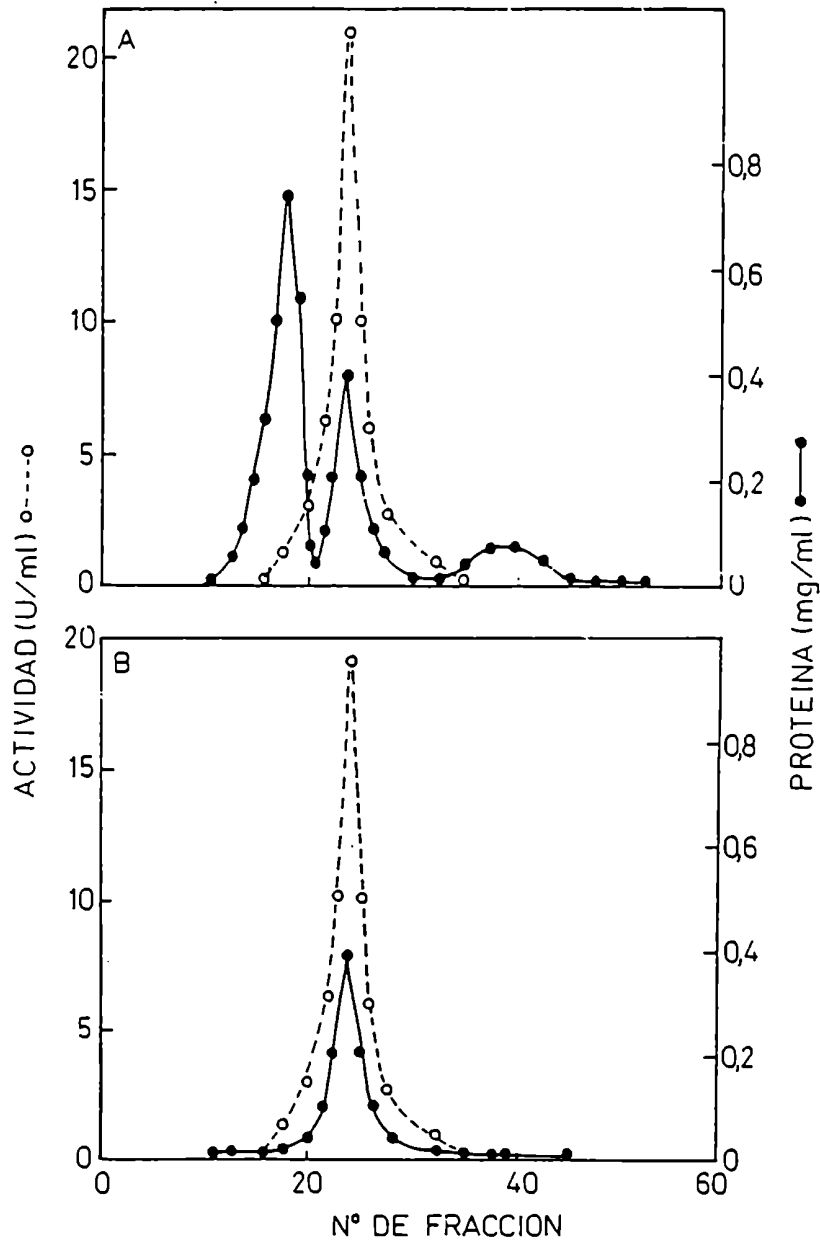


FIG.32: PERFIL DE ELUCION DE LA COLUMNA DE SEPHADEX 6-75.

A. La columna (1,1 x 60 cm) fue eluida a un flujo de 20 ml/h, recolectándose fracciones de 1 ml en buffer fosfato de sodio 0,1 mM, pH 7,6. La actividad enzimática y las proteínas se midieron de acuerdo a lo que se indica en Métodos.

B. La fracción proveniente de la columna de Sephadex 6-75 se recromatografió en idénticas condiciones a las indicadas en A.

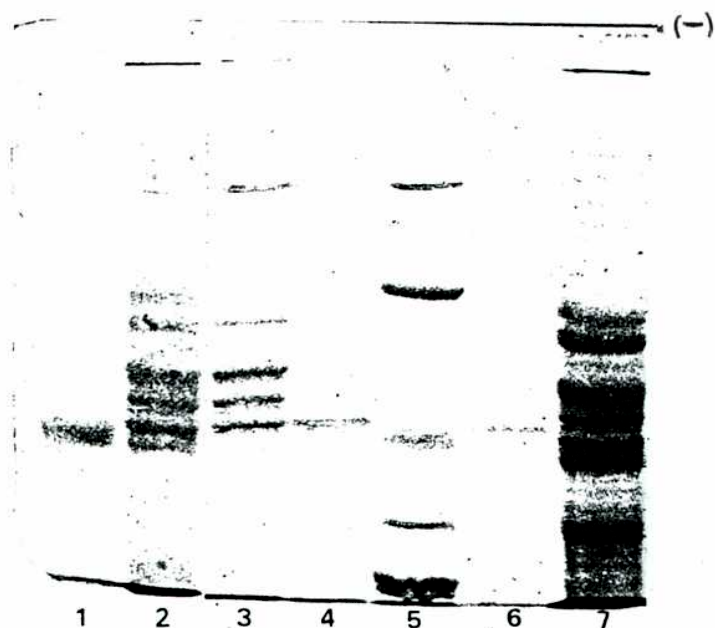


FIG. 33: ANALISIS ELECTROFORETICO POR SDS-PAGE.

Las condiciones de la corrida y del revelado se indican en Métodos. Carril 1: proteína marcadora ovoalbúmina; carril 2: eluido de DEAE celulosa (etapa 5); carril 3: eluido de Phenyl Sepharosa; carril 4: eluido de Sephadex G-75 (etapa 10), 5 μ g de proteína; carril 5: proteínas marcadoras, de arriba hacia abajo, fosforilasa B, seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y anhidrasa carbónica; carril 6: eluido de Sephadex G-75 (etapa 10), 3 μ g de proteína; carril 7: sobrenadante del calentamiento.

el método de Siegel y Monti (481) utilizando los datos del coeficiente de sedimentación y del radio de Stokes.

El $s_{20,w}$ de la enzima se obtuvo a partir de los datos de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. La PBG-D, sedimentó en un único pico simétrico en una posición cercana a la de la peroxidasa (3,5 S). De la relación lineal obtenida al graficar la distancia recorrida por las proteínas marcadoras desde el menisco del gradiente, respecto de los valores de sus $s_{20,w}$ (Fig.34) se determinó, por interpolación, el coeficiente para la PBG-D que resultó ser de 3,6 S.

Para la determinación del radio de Stokes se utilizaron los datos obtenidos luego de la filtración por columna de Sephadex G-100. De la relación lineal entre $(-\log K_{av})^{1/2}$ y los valores de r_s conocidos de los marcadores utilizados, se obtuvo por interpolación un valor de 27,5 Å para la enzima parcialmente purificada (Fig.35).

Con ambos parámetros y tomando en cuenta las consideraciones detalladas en Métodos, se calculó una masa molecular de 43.500 Da para la PBG-D nativa.

El peso molecular se obtuvo también por cromatografía de exclusión en columna de Sephadex G-100. La posición de elución de la enzima, relativa a cuatro marcadores internos se asoció con un pico único, para el cual se determinó una relación V/V_0 de 1,68 correspondiendo a un PM de 43.000 (SD[±]7%), concordando con los valores obtenidos por otros métodos, aunque éstos resultan levemente mayores que el que se obtiene por análisis del cDNA (384).

Usando la relación entre el radio de Stokes y el peso molecular para la forma prolató hidratada de la enzima, se obtuvo un cociente friccional (f/f_0) de 1,18. Esto indicaría que la PBG-D hepática humana sería una molécula relativamente simétrica.

Si se considera despreciable la influencia de la hidratación en la asimetría que puede presentar la molécula

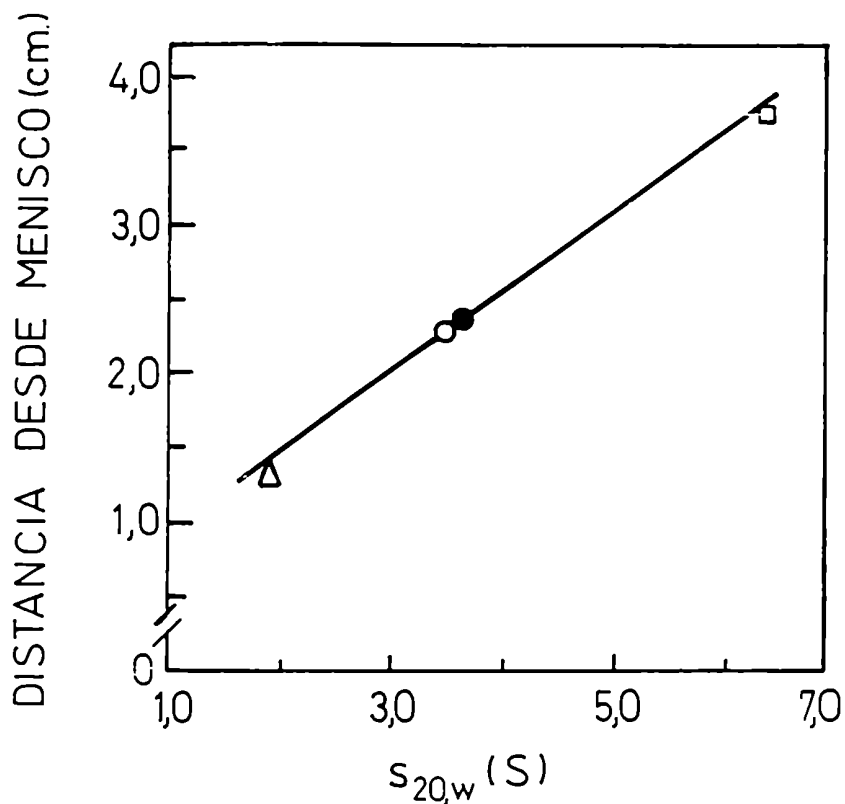


FIG.34: ESTIMACION DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTACION.

En gradientes lineales de sacarosa, como se describe en Métodos, se sembraron 250 μ l de la fracción de la etapa 7 conteniendo 100 μ g de proteína junto con 25 μ g de la mezcla de marcadores de $s_{20,w}$. La actividad enzimática en las alícuotas recogidas y la determinación de los marcadores se describe en Métodos. Se determinó la distancia desde el menisco recorrida por los marcadores, que se representó en función de sus $s_{20,w}$. La distancia de la PBG-D se interpoló en la recta obtenida (●). Los marcadores fueron: citocromo c (▲), peroxidasa (○) y fosfatasa alcalina (□).

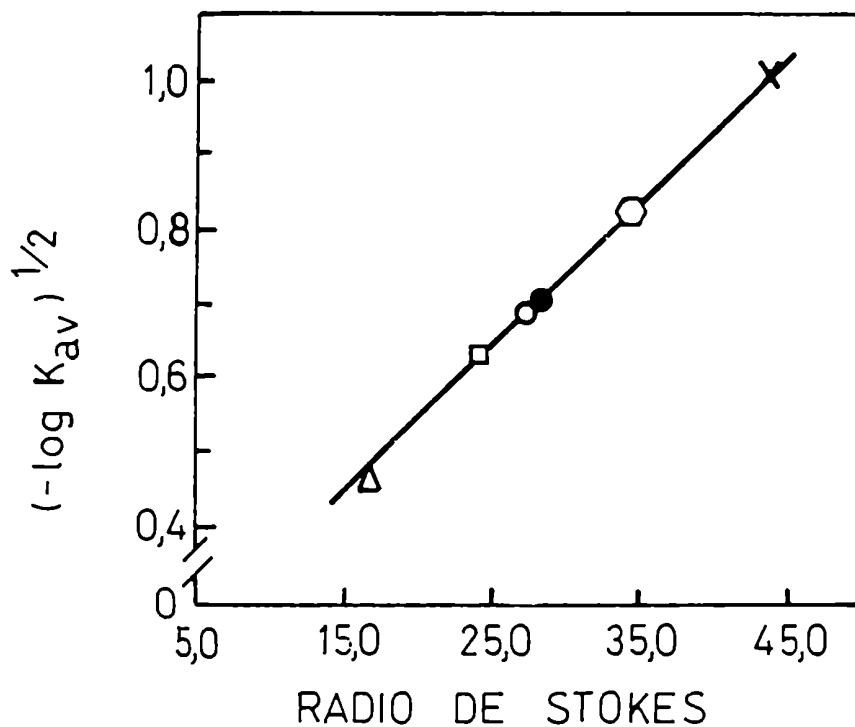


FIG.35: ESTIMACION DEL RADIO DE STOKES.

Se sembró en una columna de Sephadex G-100 (1,1 x 80 cm) 1,5 mg de proteína de la etapa 7 del esquema de purificación de PB6-D. La elución se realizó con buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,6 recolectándose fracciones de 1,8 ml. La actividad enzimática, la absorbancia de los marcadores y el cálculo del parámetro K_{av} se determinaron según se indica en Métodos. Los marcadores utilizados fueron: citocromo C (Δ), anhidrasa carbónica (\square), ovoalbúmina (\circ), monómero de albúmina bovina (\bullet) y dímero de albúmina bovina (\times). PB6-D (\bullet).

proteica es posible calcular la relación de los ejes a/b y sus respectivos valores absolutos (483). Así, para la PBG-D hepática humana se obtuvieron valores de 4, para la relación axial/ecuatorial, y de 115 Å y 20 Å para el eje largo (a) y eje corto (b) respectivamente.

También se calculó el radio para una esfera equivalente anhidra siendo el valor obtenido de 23,3 Å.

III.1.2.3.2 Formas moleculares múltiples.

Con el fin de obtener información sobre la presencia de formas múltiples de esta enzima en tejido hepático humano, se estudió la PBG-D mediante diversas aproximaciones.

a) Análisis electroforético en geles de poliacrilamida: Cuando la enzima parcialmente purificada (etapa 4) se sometió a electroforesis en condiciones no desnaturalizantes, exhibió 3 bandas proteicas activas con movilidades relativa al colorante marcador del frente de corrida de 0,53; 0,58 y 0,61 e intensidad de fluorescencia diferencial. Como se muestra en la Fig.36, la más catódica mostró la mayor actividad (\approx 45%). La intensidad diferencial de las bandas refleja la abundancia relativa de las isoformas en la preparación ensayada.

b) Isoelectroenfoque en geles de agarosa: El isoelectroenfoque de fracciones correspondientes a la etapa de calentamiento a 55-60°C durante 10 min reveló solamente una banda de actividad mayoritaria con un pI de 5,8 y ocasionalmente se detectó una banda con menor fluorescencia, más anódica, muy cercana a la anteriormente mencionada.

Cuando la enzima más purificada (etapa 4) se enfocó, se visualizaron al menos dos componentes de pI 5,8 y 5,5, siendo el más anódico el de mayor actividad relativa (Fig.37 carril a). Ocasionalmente la distribución de la actividad en estas bandas varió en diferentes preparaciones. Cuando esta fracción se incubó con exceso de PBG, durante 5 min a 37°C antes de la

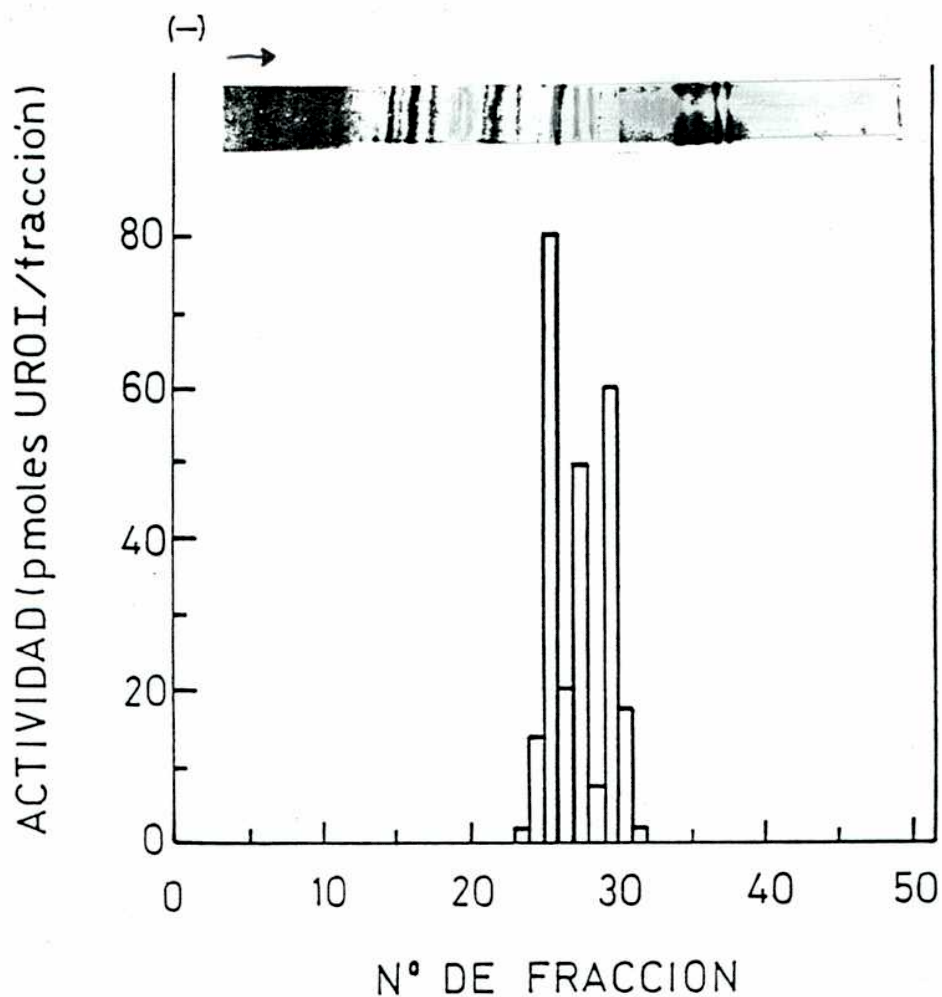


FIG.36: ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NO DESNATURALIZANTES.

300 μ g de PBG-D parcialmente purificada (etapa 4) se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (7,5% T). La actividad enzimática y la tinción de proteínas con Azul brillante de Coomassie G-250 se realizaron según se indica en Métodos.

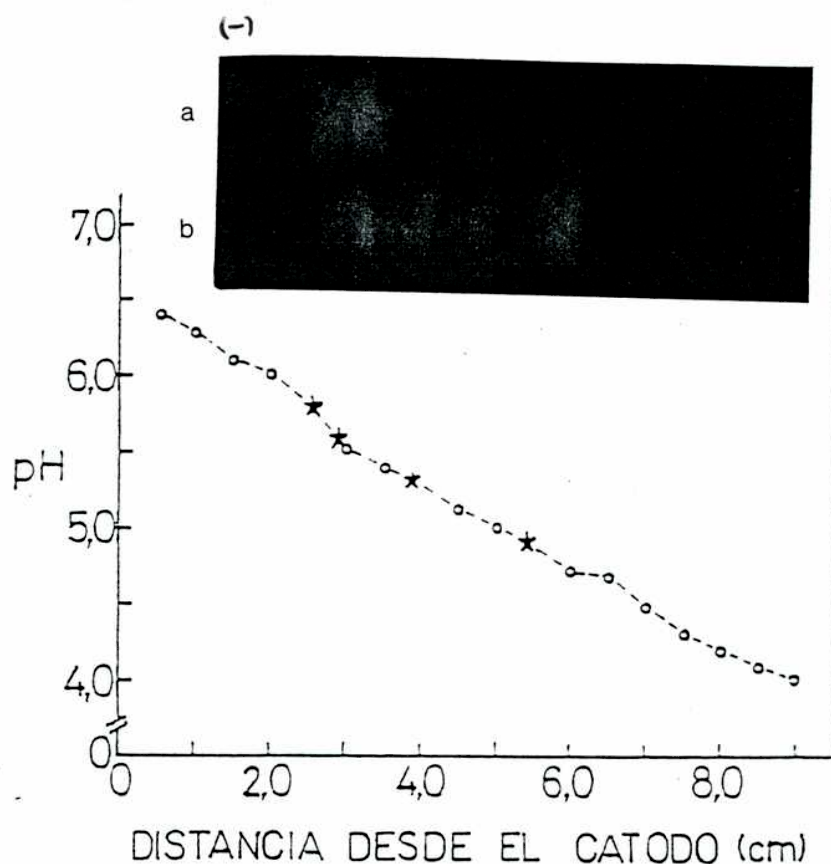


FIG.37: DETERMINACION DEL pI DE LAS FORMAS MULTIPLES DE PBG-D.

Se realizó el isoelectroenfoque de muestras correspondientes a la etapa 4 del esquema de purificación, a) sin incubar con PBG; b) preincubadas con PBG (0,2 mM) durante 5 min. El rango de pH utilizado fue 4- 6,5. Las condiciones de corrida y detección de la actividad se indican en Métodos. Los valores de pH determinados en la superficie del gel enfocado a 4°C se graficaron versus las distancias al cátodo (●). Las distancias de las bandas con actividad enzimática se determinaron después del isoelectroenfoque y revelado de las mismas (★).

siembra, se revelaron cuatro bandas de actividad con valores de pI de 5,8; 5,6; 5,2 y 4,9 como se observa en la Fig.37, carril b. Nuevamente la mayor actividad relativa correspondió al componente de menor pI. Estos perfiles sugieren la existencia de complejos intermediarios enzima-sustrato en los varios pasos que conforman la polimerización secuencial del PBG que esta enzima cataliza como fue propuesto por Anderson y Desnick (331) y Jordan y Berry (373).

Con el fin de investigar la masa de las formas moleculares, cuya heterogeneidad de carga se había puesto de manifiesto en la cromatografía de DE-52 (picos A, B y C; Fig.31) se estudió el comportamiento de cada una de ellas, ultracentrifugándolas en gradientes de sacarosa y filtrándolas por columnas de Sephadex G-100. La sensibilidad de estas metodologías no permitió la observación de diferencias en los parámetros $s_{20,w}$ y r_g . Consecuentemente, el PM calculado a partir de los mismos coincidió con el obtenido cuando mezclas de las formas moleculares fueron analizadas en experiencias similares.

III.1.2.3.3 Análisis cinético

Para estos estudios se utilizó enzima parcialmente purificada correspondiente a la fracción eluida de DEAE-celulosa.

En condiciones de ensayo estándar se comprobó que la formación del producto de la reacción, URO I, es lineal durante el tiempo de incubación ensayado, al menos hasta una hora. La actividad catalítica fue además proporcional a la cantidad de enzima, ensayada en un amplio rango (30 a 800 μ g).

La curva de saturación de la enzima estudiada en concentraciones de sustrato en el rango 2 a 200 μ M mostró un comportamiento hiperbólico, no observándose inhibición por sustrato después de 30 min de incubación hasta concentraciones de PBG de 400 μ M. La curva de velocidad inicial (v) versus

concentración de sustrato [S] alcanzó el plateau a valores cercanos a $30 \mu\text{M}$ de PBG. Del análisis de los datos mediante la representación de las doble recíprocas se obtuvo un valor de $K_m = 4,0 \mu\text{M}$ como se ilustra en la Fig.38.

Los parámetros cinéticos K_m y $V_{\text{máx}}$ se determinaron además, de acuerdo al método de Miguel Merino (499) a pH 7,5 usando la ecuación de Michaelis-Menten diferenciada respecto de [S]:

$$v' = \left\{ \frac{K_m(v - [S]v')}{[S]^2} \right\}; \quad \text{siendo } v' = dv/d[S].$$

Se define $R = (v/[S]v') - 1$ y la ecuación reestructurada queda: $R = [S]/K_m$. Este valor R puede ser calculado para cada concentración de sustrato y su respectiva v. Se obtuvieron así, ocho valores R_i para cada par de valores $[S]_i$ y v_i . Un análisis estadístico de los datos tal como la varianza de \bar{R}_i , mostró una falta de homocedasticidad, la cual pudo corregirse cuando consideraron los cocientes $\bar{R}_i/[S]_i$. Así, graficando \bar{R}_i vs $[S]_i$ obtuvo una línea recta que pasa por el origen, como puede observarse en la Fig.39. A partir de la pendiente del gráfico se calculó el valor de K_m que resultó ser $3,6 \mu\text{M}$ (SEM $\pm 0,3$ para seis determinaciones). Por otra parte, si se aplica la fórmula computacional $K_m = n/\sum(\bar{R}_i/[S]_i)$, el valor obtenido es de $3,8 \mu\text{M}$. El valor promedio de $V_{\text{máx}}$ se calculó entonces para esta fracción de enzima parcialmente purificada, obteniéndose un valor de $0,84 \text{ U/mg}$.

Cuando se determinó el K_m a pH 7,6 (valor óptimo) se obtuvo un valor de $3,3 \mu\text{M}$.

El K_m determinado para la enzima hepática humana, si bien menor al informado para la enzima eritrocitaria (331, 394), se halla dentro del mismo orden de magnitud que aquellos descritos en la literatura para otras fuentes de mamíferos (120, 361).

La estequiometría de la reacción se determinó estableciendo el cociente entre la cantidad de PBG consumido y la cantidad de URO I formada. Valores de este cociente entre 3,8 y 4,7 indican que alrededor de 4 moles de sustrato son consumidos por mol de

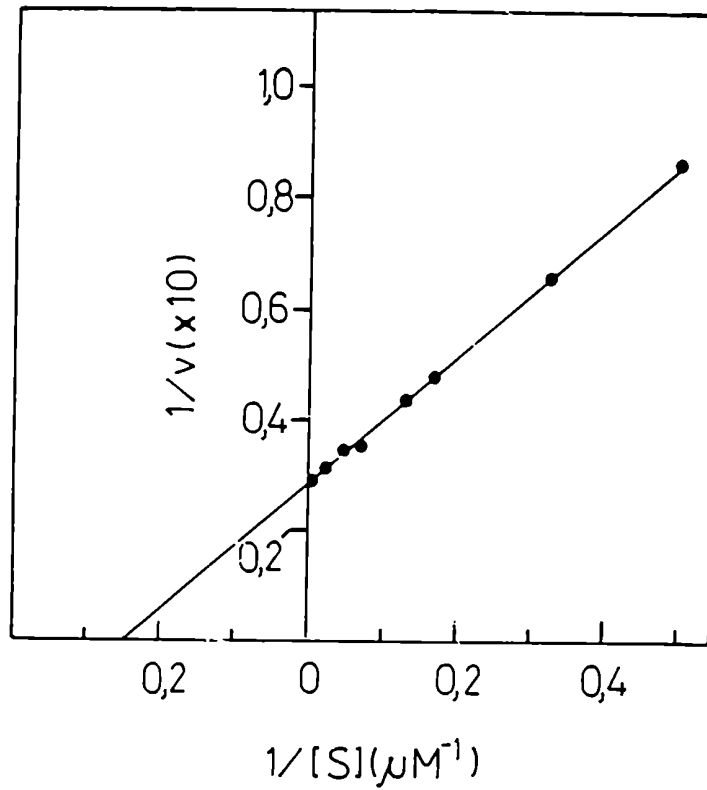


FIG.38: DETERMINACION DE LAS CONSTANTES CINETICAS. GRAFICO DE DOBLES RECIPROCAS.

Las velocidades iniciales se determinaron midiendo la producción de uroporfirina I, como se detalla en Métodos. Las concentraciones de PBG utilizadas abarcaron un rango de 2 a 200 μM . Las unidades de v se expresan en nmoles de URO I/h.eg.

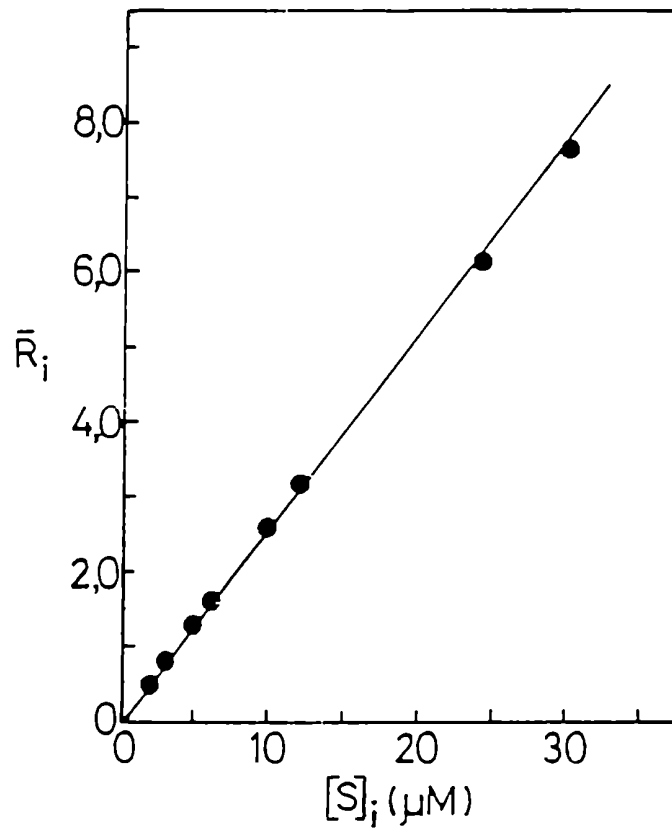


FIG.39: DETERMINACION DEL K_m .

El valor se obtuvo de la pendiente del gráfico de \bar{R}_i versus $[S]_i$ de acuerdo con la ecuación $\bar{R}_i = [S]_i / K_m$. El gráfico mostrado es representativo de las seis determinaciones realizadas.

producto formado, concordando con la ecuación teórica. Los valores más altos obtenidos para este cociente corresponden a tiempos cortos de incubación (30 a 60 min), mientras la enzima trabaja a saturación. A tiempos suficientemente largos, después de la consumisión total del sustrato, se forman porfirinas con un rendimiento del 100%. Este comportamiento es compatible con la presencia de complejos intermediarios enzima-sustrato (331, 338).

El efecto del pH sobre la actividad polimerizante del PBG se estudió analizando los cambios de $V_{\text{máx}}$ con la concentración de protones. Se estudió, además, la estabilidad de la enzima a 37°C en el rango de pH 4,0 hasta 12,0.

La representación de $V_{\text{máx}}$ versus pH mostró la clásica curva con forma de campana, exhibiendo un pH óptimo de 7,6 tanto en buffer fosfato 0,1 M como en buffer Tris-HCl 50 mM medidos a 37°C. La actividad decrece bruscamente a pH más ácidos, siendo casi nula por debajo de pH 6,0. A valores más alcalinos, la actividad puede ser aún medida a pH 9,5 con un valor residual del 30%. Con los datos de $V_{\text{máx}}$ se construyeron los gráficos de Dixon (500). Se obtuvieron así los valores de pK_{es} , que corresponden a los puntos de intersección de las líneas trazadas en la Fig.40 y que dieron valores para $pK_{\text{es}1} = 7,35$ y para $pK_{\text{es}2} = 8,90$. Del análisis de estos resultados se puede inferir que dos grupos ionizables son esenciales para las etapas que determinan la velocidad de la reacción enzimática. De igual forma que lo expuesto para la enzima de rata y considerando la complejidad de la reacción de polimerización secuencial de cuatro moléculas de sustrato sin liberación de intermediarios, que catalizan estas proteínas, no resulta posible adscribir alguno de estos valores a un paso en particular de los complejos E-S.

Los estudios de estabilidad llevados a cabo a 37°C mostraron que a pH ácido la actividad de la enzima permanece constante aún a pH 4,6, después de 30 min de preincubación. Un

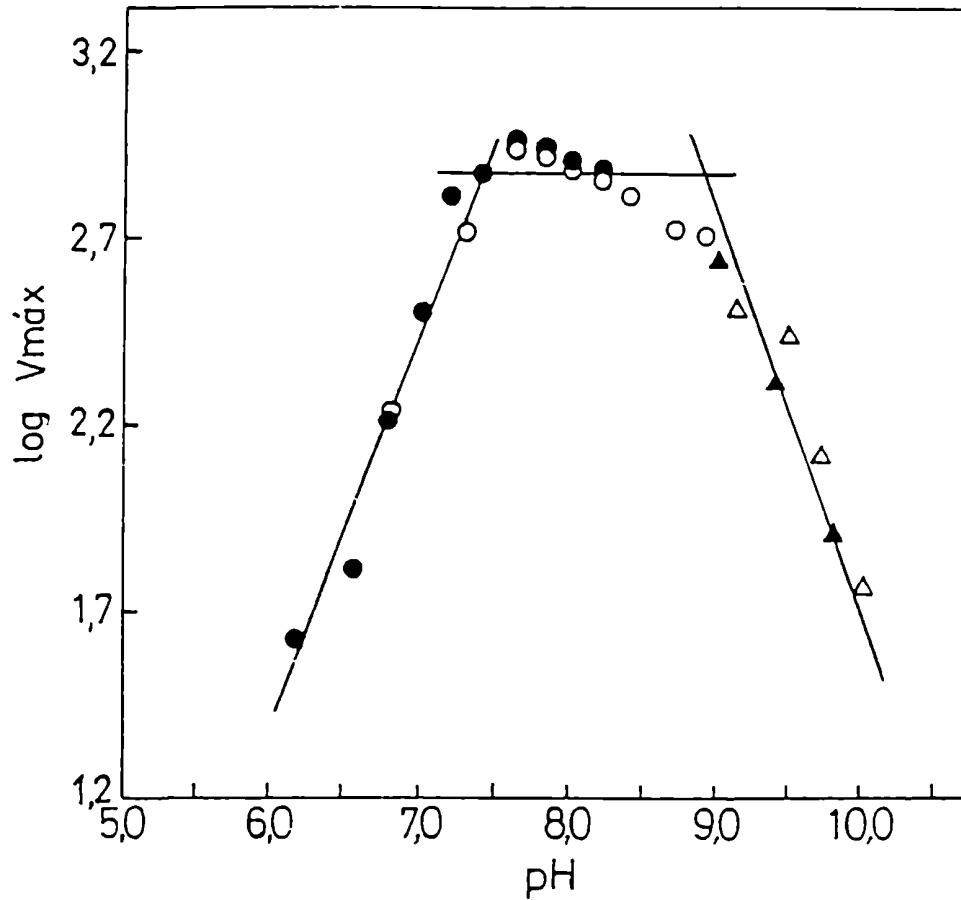


FIG.40: DEPENDENCIA DE $V_{máx}$ CON EL pH.

Se utilizaron los siguientes buffers, cuyos pH se determinaron a 37°C: fosfato de sodio 0,1 M (●); Tris-HCl 0,05 M (○), glicina-NaOH 0,1 M (▲) y bórax-NaOH 0,1 M (△). La actividad de la fracción correspondiente a la etapa 5 del esquema de purificación se ensayó según se indica en Métodos. Las unidades de $V_{máx}$ se expresan en nanoles de URO i/h.µg.

comportamiento similar se encontró en el rango básico, siendo estable hasta pH 10,2. Es importante destacar que a pH menores o iguales a 4,2 la enzima es instantáneamente inactivada (95% a 2 min) mientras que retiene aproximadamente el 25% de su actividad inicial después de 30 min. de preincubación a pH 11,5.

Recientemente, se informó la existencia de un cofactor dipirrometano unido covalentemente a la PBG-D en su sitio catalítico (342, 343), y que el carbono libre del dipirrol es el sitio del enlace covalente de la primera molécula del sustrato. A pH menor que 4 y en presencia de O₂ este cofactor sufre una transformación irreversible a dipirrometeno, generando una holoenzima ahora inactiva, incapaz de unir PBG. Por lo tanto, la existencia de formas inactivas de la holoenzima además de la inactivación producida por desnaturalización debería ser considerada en estudios de estabilidad de la enzima respecto del pH. Esto puede así explicar la abrupta pérdida de actividad observada a pH 4,2.

En los estudios de los factores que afectan la reacción de polimerización enzimática, la temperatura mostró su efecto activante aún a valores mayores que los fisiológicos, exhibiendo un máximo alrededor de 65°C. Como puede observarse en la Fig.41 lo hace con un incremento de la velocidad de 8,3 veces respecto de la observada a 37°C. Más allá de estos valores de temperatura prevaleció el proceso de inactivación de la proteína.

La representación de Arrhenius (Fig.41) mostró un comportamiento bifásico de la actividad, con un consecuente cambio de pendiente a los 50°C. Se calcularon las energías de activación para ambas rectas obteniéndose los siguientes valores: $E_a = 86,6$ kJ/mol para el rango 25-50°C y $E_a = 46,9$ kJ/mol para el rango 50-65°C.

Se examinó la estabilidad térmica de la proteína, preincubándola durante diferentes periodos de tiempo y a

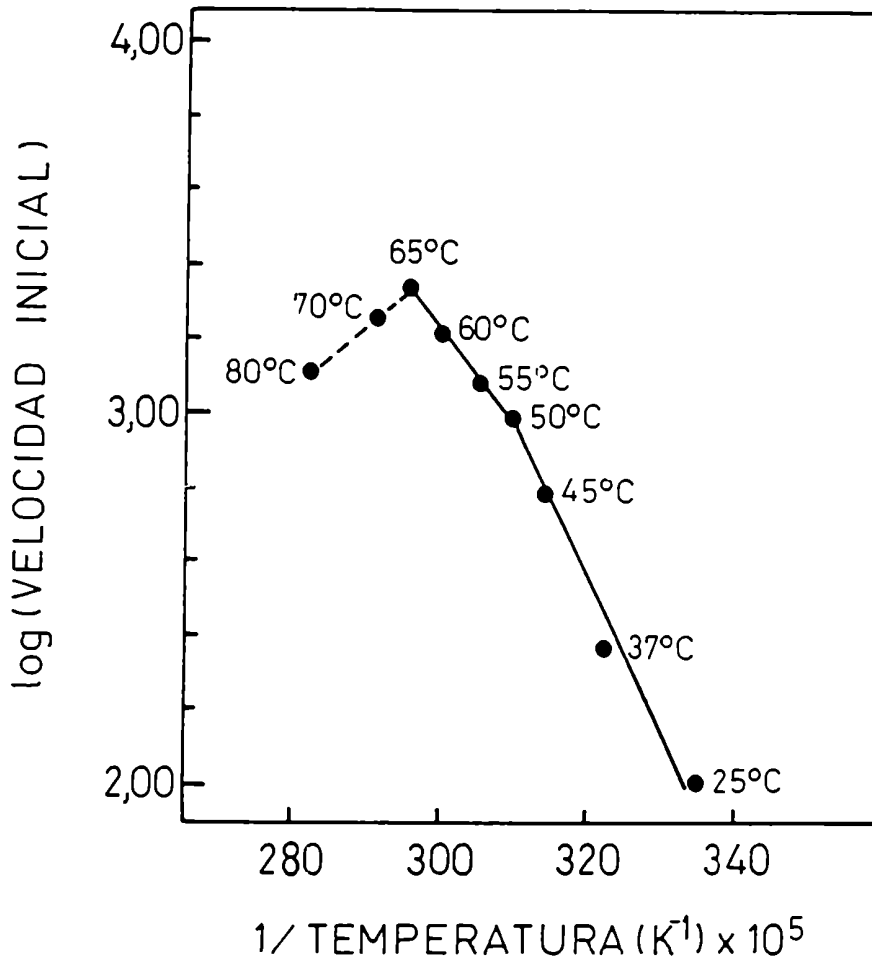


FIG.41: EFECTO DE LA TEMPERATURA. GRAFICO DE ARRHENIUS.

La actividad enzimática se midió como se describe en Métodos, incubando la enzima con sustrato a las temperaturas indicadas. Se determinaron siempre velocidades iniciales cuyas unidades se expresan en moles de URO l/h.mg. Su valor a 37°C para la fracción correspondiente a la etapa 4 del esquema de purificación fue 24 moles de URO l/h.mg. Los resultados representan valores promedios de tres determinaciones.

diversas temperaturas (37-80 C) sin el agregado del sustrato y posteriormente incubándola en las condiciones de ensayo estándar (Fig.42).

El análisis de los resultados reveló que no hubo pérdida significativa de la actividad por preincubación en el rango 37-55°C hasta los 45 min ensayados. El pretratamiento a 70°C durante 5 min mostró una capacidad residual de 56%. Sin embargo cuando se realizó a 80°C durante el mismo tiempo, la actividad resultó muy baja (20% del valor a 37°C).

De todos estos resultados se demuestra también para esta proteína la propiedad de termoestabilidad que caracteriza a todas las FBG-D investigadas ya sea de organismos pro como eucariotes.

III.1.2.4 Aminoácidos relacionados con el proceso catalítico

III.1.2.4.1 Efecto de modificadores químicos de aminoácidos básicos

La presencia de grupos cargados negativamente tanto en el sustrato como en el producto polipirrólico de la FBG-D, permiten suponer la presencia en la enzima de residuos con carga positiva que pudieran interactuar con ellos, controlando la actividad enzimática. Con esta hipótesis de trabajo y los resultados previamente informados por otros investigadores, en estudios con FBG-D de otras fuentes (350, 354, 357) se examinó el efecto de modificadores químicos de aminoácidos básicos en la reacción catalizada por la FBG-D hepática humana.

Debido a que la histicina posee un pKa cercano al pH fisiológico, se estudió su importancia en la reacción catalizada por la enzima, para ello se analizó el efecto del dietilpirocarbonato como reactivo modificador. Aunque se ensayaron diferentes condiciones para su reacción variando la temperatura (0°C y 25°C), el tiempo (0 a 20 min), la

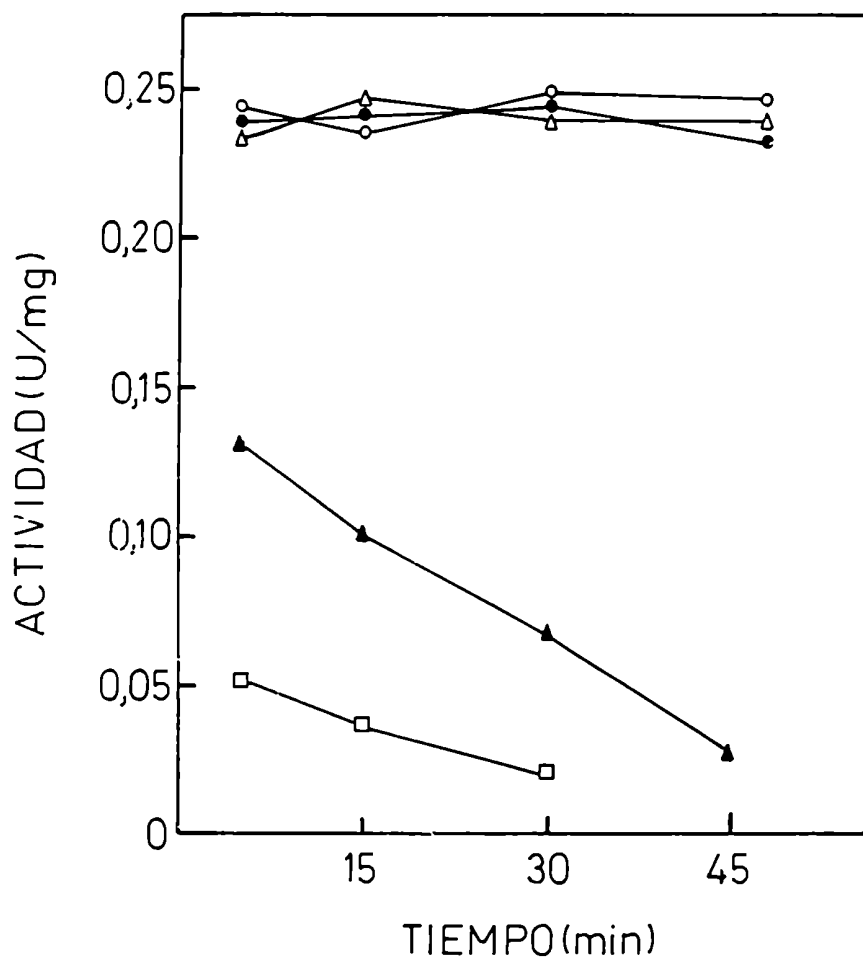


FIG.42: TERMOESTABILIDAD DE LA PB6-D.

PB6-D en la etapa 4 del esquema de purificación (0,24 U/mg) se preincubó a 37°C (●), 50°C (Δ), 55°C (○), 70°C (▲) y 80°C (□) durante los periodos de tiempo indicados. La actividad residual se ensayó como se describe en Métodos.

concentración del modificador (0,35 a 15,5 mM) y el pH (6,5 y 7,6) no se observaron efectos significativos del ligando sobre la velocidad de formación del producto. Estos resultados permiten suponer que el aminoácido en cuestión no intervendría en la catálisis enzimática.

Cuando se investigó el efecto de la fotooxidación sobre la enzima, a pH 6,8, se utilizaron dos sensibilizadores: Rosa de Bengala y Azul de metileno iluminando con luz de 100 watts. En la Fig.43 se muestra la curva de actividad remanente en función del tiempo de iluminación cuando se usó Rosa de Bengala. Del análisis de los resultados se obtuvo un valor de inactivación máxima del 60% para la concentración de 0,03% del colorante y de 75% para la de 0,06% después de 20 minutos de iluminación. A tiempos más cortos de iluminación (3 min) la inactivación resultó aproximadamente proporcional a la concentración del sensibilizador siendo de 27% y de 50% para las concentraciones 0,03% y 0,06% respectivamente.

Cuando se ensayó el efecto del Azul de metileno se obtuvo un comportamiento similar al observado con Rosa de Bengala, como se aprecia en la Fig.44. Sin embargo, la inactivación alcanzada resultó significativamente mayor, siendo del 87% para 0,03% y 95% para 0,06% luego de 20 min de iluminación. Inactivaciones del 40% y 70% se observaron a los 2 min de iluminación para las concentraciones 0,03% y 0,06% respectivamente.

Estos resultados sugieren que residuos triptofanos serían importantes para el proceso catalítico mediante una interacción de tipo hidrofóbico con el sustrato y/o producto. Por otra parte, el aumento de la inactivación con la concentración de los sensibilizadores una vez que la velocidad de reacción disminuyó sensiblemente podría indicar la oxidación de otro aminoácidos que interaccionan mucho más lentamente.

Frydman y Frydman (356), cuyos resultados son concordantes con los aquí presentados, han señalado que deaminasas de

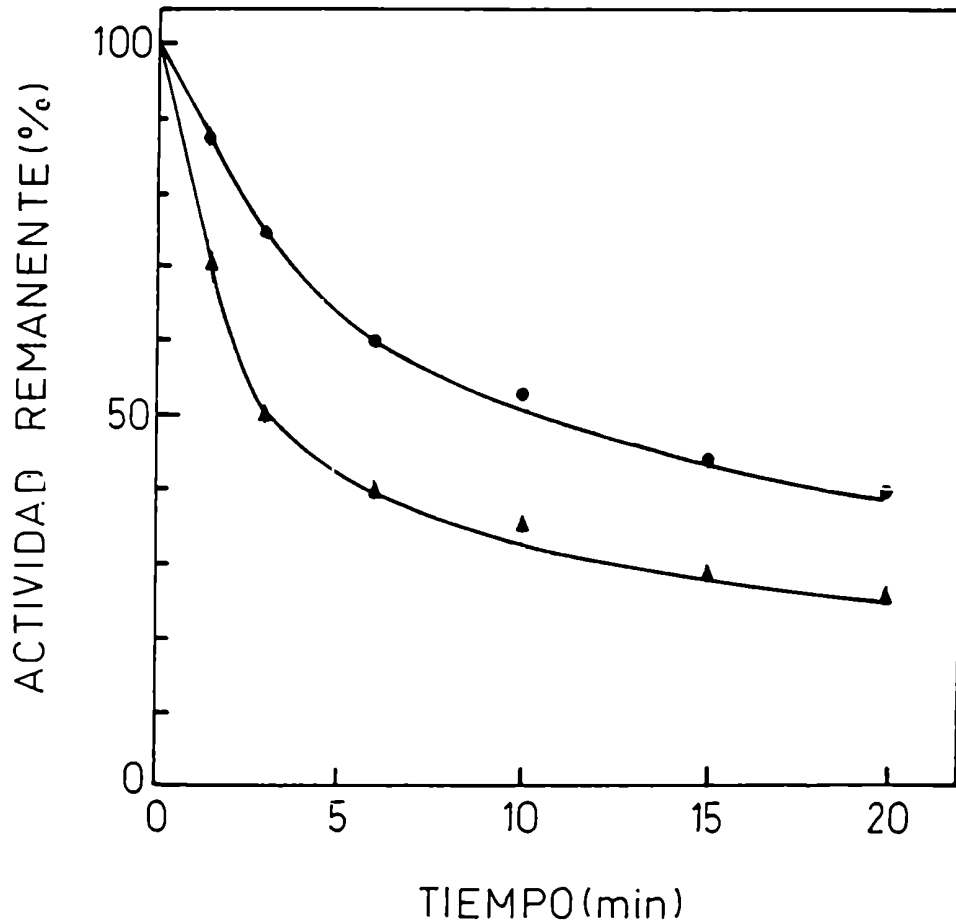


FIG. 43: CURSO DE INACTIVACION POR ROSA DE BENGALA.

PBG-D (9,5 U/ml de mezcla de incubación) y Rosa de Bengala en concentraciones de 0,03% (●) y 0,06% (▲) se incubaron durante los tiempos indicados en buffer fosfato de sodio 3 mM, pH 6,8 en tubos de 1 x 7 cm en baño de hielo y con iluminación proveniente de una lámpara de 100 watts colocada a 20 cm de los tubos. A los tiempos indicados se adicionaron buffer y sustrato para la determinación de la actividad enzimática según se indica en Métodos. La actividad específica del control fue de 6,2 U/mg. Los valores graficados representan promedios de tres ensayos.

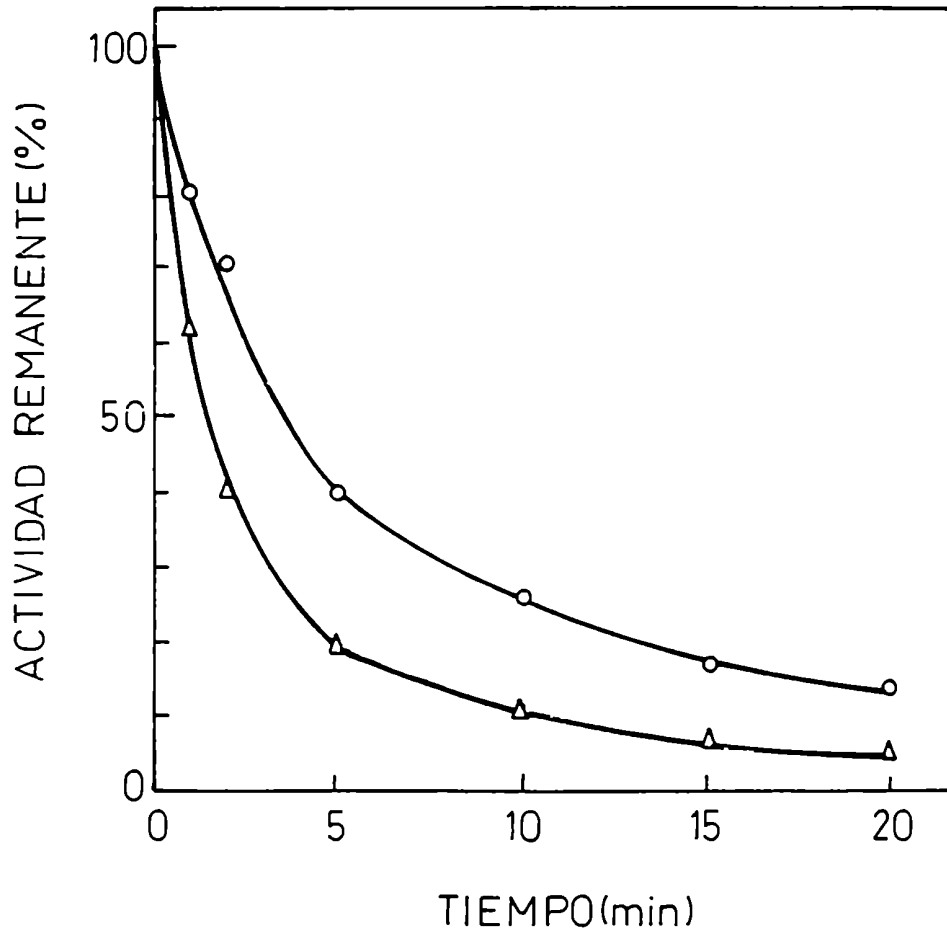


FIG.44: CURSO DE LA INACTIVACION POR AZUL DE METILENO.

Las condiciones de ensayo fueron iguales a las indicadas en la Fig.43. Los valores graficados representan los valores promedios correspondientes a tres experiencias. Concentraciones de Azul de metileno: 0,03% (o) y 0,06% (Δ).

diferentes orígenes resultan eficientemente inactivadas por fotooxidación en presencia de Azul de metileno y sólo moderadamente con Rosa de Bengala. Observan además, que la oxidación de triptofano resulta paralela a la disminución de la actividad enzimática de la PBG-D de germen de trigo.

Para la enzima proveniente de eritrocitos humanos se ha informado una inactivación del 90% con Azul de metileno 0,03% luego de 5 min de iluminación y del 60% con Rosa de Bengala (114).

Cuando se quiso investigar la eventual participación en la catálisis de la arginina, su rol se estudió con el reactivo fenilglioxal (FG) en buffer Heppes-NaOH 50 mM, pH 8,1 a 20°C. El curso de la inactivación para distintas concentraciones del rector (1,3 a 7,8 mM) se muestra en la Fig.45, obteniéndose una inactivación del 60% luego de 1 min de interacción del modificador con la enzima a la mayor concentración probada. Esta reacción tan rápida implicaría que una arginina o varias se hallan muy expuestas e involucradas en el proceso catalítico. En ensayos de preincubación con el sustrato y el modificador se encontró que el PBG protege parcialmente a la enzima del efecto del FG como se muestra en la Tabla IX, lo que sugiere que la modificación podría ocurrir en el centro activo.

Para la enzima proveniente de E. coli se ha informado que la interacción con este reactivo en concentración 10 mM a 20°C y en buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 produce una inhibición del 25% después de 20 min de incubación (379).

Pollack y Russell (350) y Russell y col. (357) reportaron para la proteína de germen de trigo, después del estudio de su interacción con 2,3 butanediona y FG que un residuo de arginina es esencial en el sitio activo de la PBG-D.

Sharif y col. (390) han informado, en un estudio comparativo de las secuencias de aminoácidos de la PBG-D de E. gracilis, E. coli y eritrocitos humanos, la presencia de doce argininas conservadas sugiriendo que podrían estar involucradas

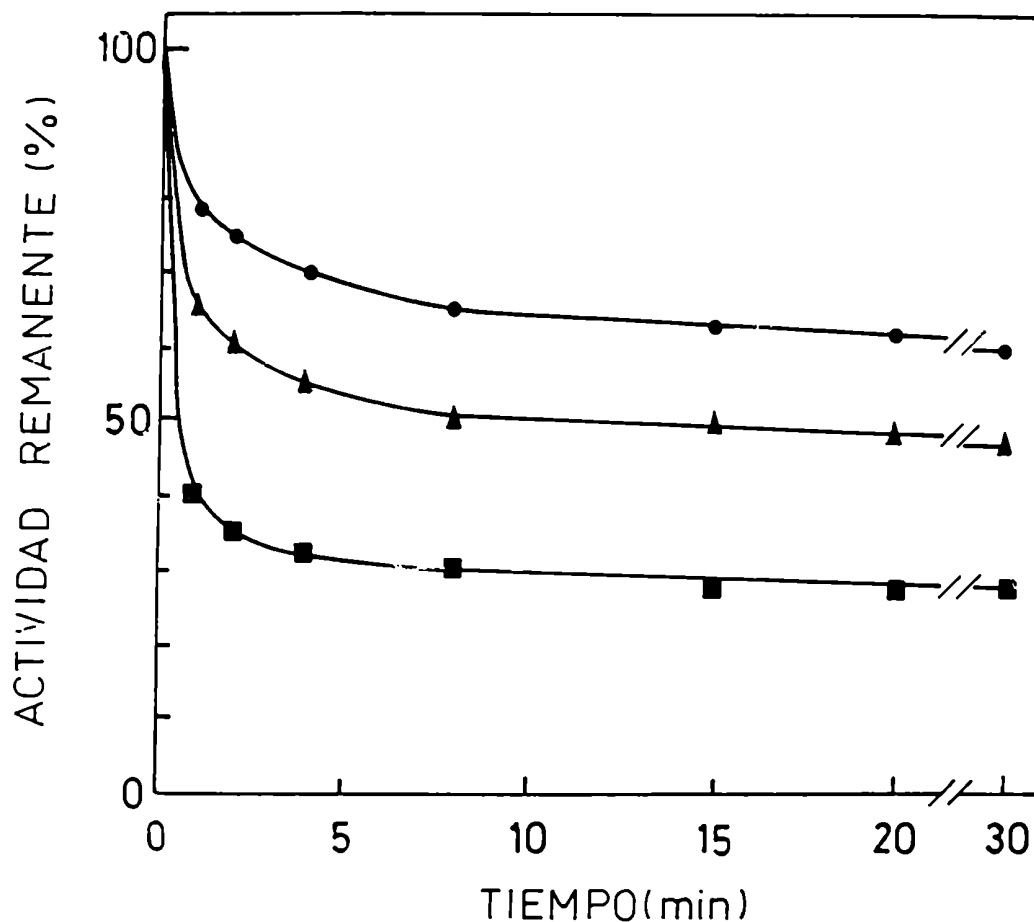


FIG.45: CURSO DE LA INACTIVACION POR FG.

PBG-D (9,5 U/ml de mezcla de incubación) y el reactivo en concentraciones 1,3 mM (●); 3,9 mM (▲) y 7,8 mM (■) se incubaron en buffer Hepes-NaOH 50 mM, pH 8,1 a 20°C. A los tiempos indicados se retiraron alícuotas de 50 μ l a las que se agregaron arginina 8 mM, buffer y sustrato para la medición de la actividad enzimática según se indica en Métodos. La actividad específica del control fue de 6,6U/mg. Los valores graficados representan los promedios de tres experiencias.

en la unión de las cuatro cadenas laterales con grupos ácidos presentes en el cofactor dipirrometano en las ocho correspondientes al producto tetrapirrólico.

TABLA IX: EFECTO DE LA PREINCUBACION CON EL SUSTRATO EN LA INACTIVACION POR FG.

a) PBG-D (9,5 U/ml de mezcla de incubación) y FG 1,3 mM se preincubaron en buffer Hepes-NaOH 50 mM, pH 8,1 a 20°C durante 10 min en presencia de PBG 0,4 mM. Al tiempo indicado se adicionaron arginina 8 mM y buffer para la determinación de la actividad enzimática según se indica en Métodos. Los controles se realizaron reemplazando en la preincubación el PBG o el FG por buffer. b) La enzima se preincubó con el sustrato (0,4 mM 5 min a 20°C y luego con FG 1,3 mM 10 min a 20°C. Los controles se realizaron reemplazando en la preincubación el PBG o el FG por buffer. Los datos presentados son promedios de tres determinaciones.

PBG-D preincubada con:	Actividad (U/mg)	Inhibición (%)
PBG y buffer (10 min)	6,8	0
PBG y FG (10 min)	5,7	16
buffer y FG (10 min)	4,4	30
b) PBG (5 min) y buffer (10 min)	6,5	0
PBG (5 min) y FG (10 min)	5,8	10
buffer (5 min) y FG (10 min)	4,5	30

III.1.2.4.2 Efecto de modificadores químicos de aminoácidos ácidos

Similarmente a lo expuesto sobre la posible interacción con aminoácidos básicos, la presencia de cargas positivas en las moléculas de sustrato, así como en el producto (NH_4^+), permite suponer que tengan lugar interacciones entre dichas cargas y residuos aminoácidos cargados negativamente de la enzima.

Con el fin de analizar este evento, los grupos carboxilos de la enzima fueron modificados con un agente específico como lo es el reactivo K de Woodward (WRK) o N-etil-5-feniloxazolum-3'-sulfonato. Se observó, como se muestra en la Fig.46, una inactivación de la PBG-D por acción del WRK, en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 6,2 a 20°C, dependiente del tiempo de interacción probado (0 a 4 min) y de la concentración del modificador ensayada cuyo rango estuvo comprendido entre 0,5 y 40 mM. después de 120 seg se alcanzaron valores de actividad residual aproximadamente constantes para las concentraciones utilizadas, debido probablemente a la hidrólisis rápida del reactivo al pH del ensayo. Para la concentración 20 mM se produjo la pérdida total de actividad.

El análisis de los datos graficados en la Fig.47 muestra que la inactivación sigue una cinética bifásica con una fase muy rápida (hasta los 17 a 37 seg) y otra más lenta; este comportamiento señala la presencia de grupos con reactividad diferencial.

La dependencia con el pH de la interacción enzima-WRK mostró un aumento del efecto con la concentración de protones alcanzándose valores prácticamente constantes a pH igual o mayor que 7,6 (Fig.48).

Estos resultados sugieren que la reacción tendría lugar con grupos carboxilos desprotonados.

El PBG impide sólo parcialmente el efecto del WRK como se muestra en la Tabla X, lo que permite inferir que la modificación podría ocurrir en el centro activo variando la conformación del mismo y afectando especialmente a la catálisis.

La enzima de germen de trigo se inactiva también por acción del WRK según un comportamiento dependiente del tiempo y la concentración del reactivo siendo este efecto mayor a pH 8,2 que a pH 4,5 (357).

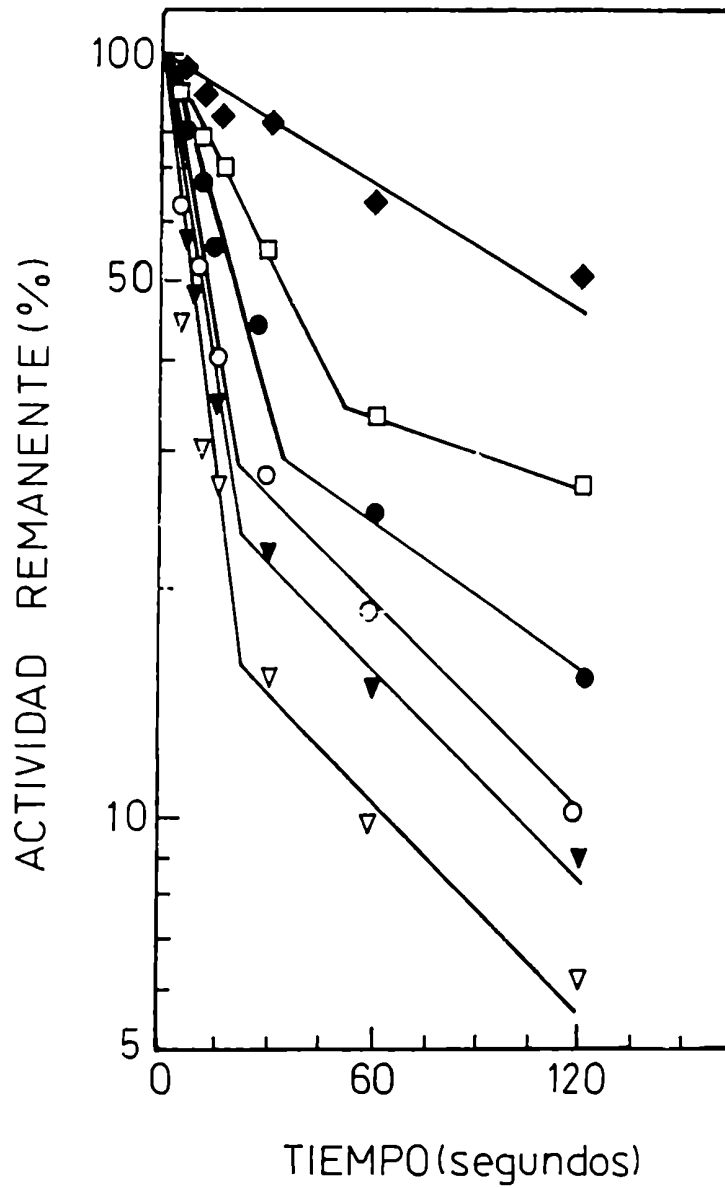


FIG.47: CINÉTICA DE INACTIVACION POR WRK.

Los datos graficados se obtuvieron a partir de los presentados en la Fig.46, a excepción de los correspondientes a las concentraciones de WRK 30 mM (▼) y 40 mM (▽) para las que se ensayó el efecto de concentración vs. tiempos de preincubación (hasta 120 seg.) en condiciones idénticas a las indicadas en la Fig.46.

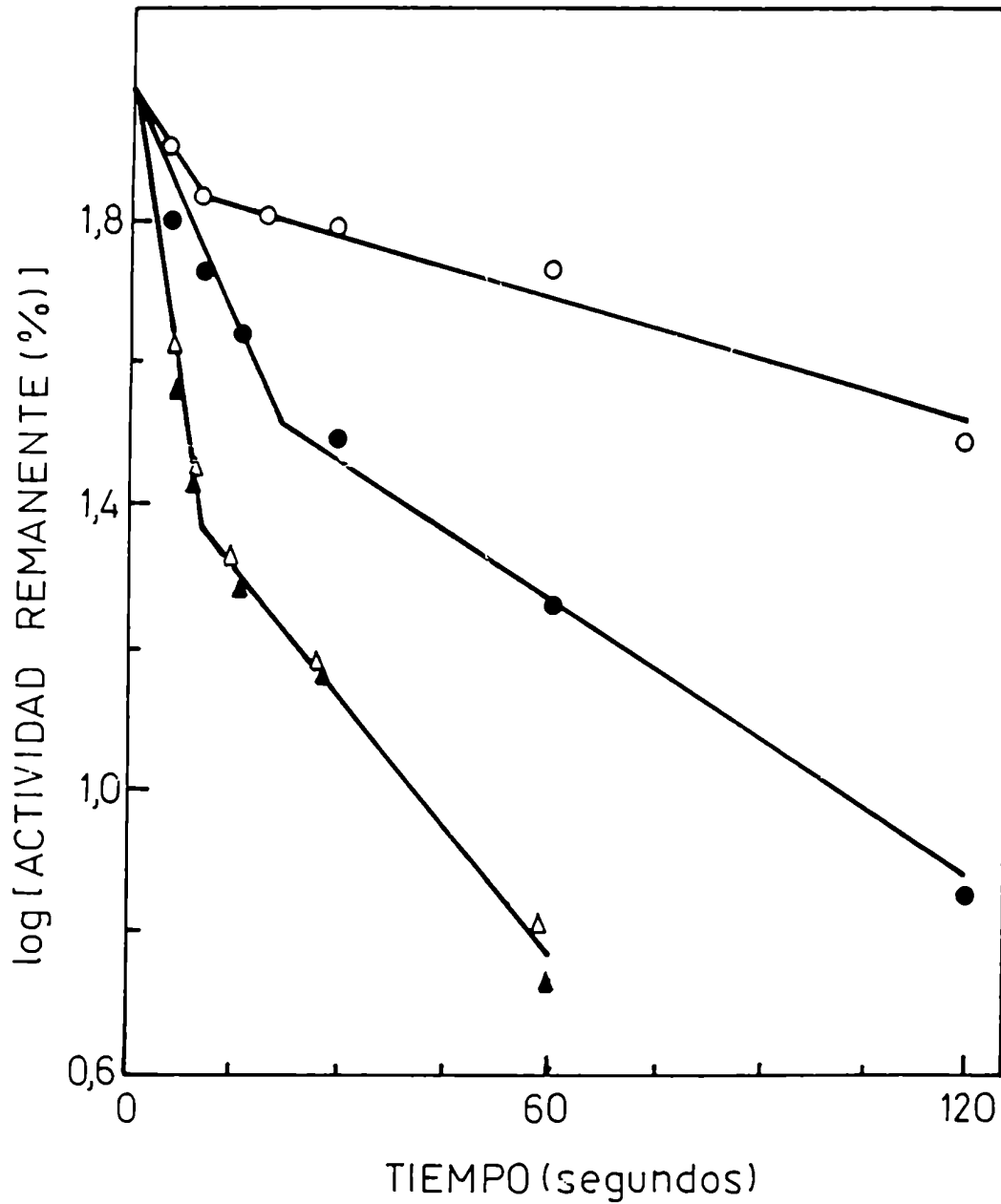


FIG.48: CINÉTICA DE INACTIVACION POR WRK A DISTINTOS pH.

La metodología empleada es igual a la descrita en la Fig.46 para una concentración de WRK de 20 μ M, salvo que los buffers de preincubación fueron: acetato 50 μ M, pH 5,0 (○); fosfato de sodio 50 μ M, pH 6,2 (●); fosfato de sodio 50 μ M, pH 7,6 (△) y fosfato de sodio 50 μ M, pH 8,2 (▲).

TABLA X: EFECTO DE LA PREINCUBACION CON EL SUSTRATO EN LA INACTIVACION POR WRK.

a) PBG-D (9,5 U/ml de mezcla de incubación) y WRK 10 mM se preincubaron en buffer Fosfato de sodio 50 mM, pH 6,2 a 20°C durante 60 seg en presencia de PBG 0,4 mM. Al tiempo indicado se adicionó buffer para la determinación de la actividad enzimática según se indica en Métodos. Los controles se realizaron reemplazando en la preincubación el PBG o el WRK por buffer. b) La enzima se preincubó con el sustrato (0,4 mM 5 min a 20°C y luego con WRK 10 mM 60 seg a 20°C. Los controles se realizaron reemplazando en la preincubación el PBG o el WRK por buffer. Los datos presentados son promedios de tres determinaciones.

PBG-D preincubada con:	Actividad (U/mg)	Inhibición (%)
a) PBG y buffer (60 seg)	6,8	0
PBG y WRK (60 seg)	4,1	40
buffer y WRK (60 seg)	2,7	60
b) PBG (5 min) y buffer (60 seg)	7,1	0
PBG (5 min) y WRK (60 seg)	4,6	35
buffer (5 min) y WRK (60 seg)	2,8	60

Los estudios realizados con 1-ciclohexil-3-(2-morfolinoetil) carbodiimida (CMC) mostraron una disminución de la actividad enzimática en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 6,2 a 20°C dependiente del tiempo y la concentración, siendo el efecto observado, como se muestra en la Fig.49, de menor magnitud que el correspondiente al WRK, ya que incubaciones con CMC 44 mM, durante 30 min, produjeron una inactivación del 58%.

La cinética de la inactivación mostró ser monofásica (Fig.50).

De estos resultados, al igual que de los obtenidos con WRK, se puede suponer que al menos un grupo carboxilato estaría involucrado en el proceso catalítico participando de las interacciones que tienen lugar en el centro activo.

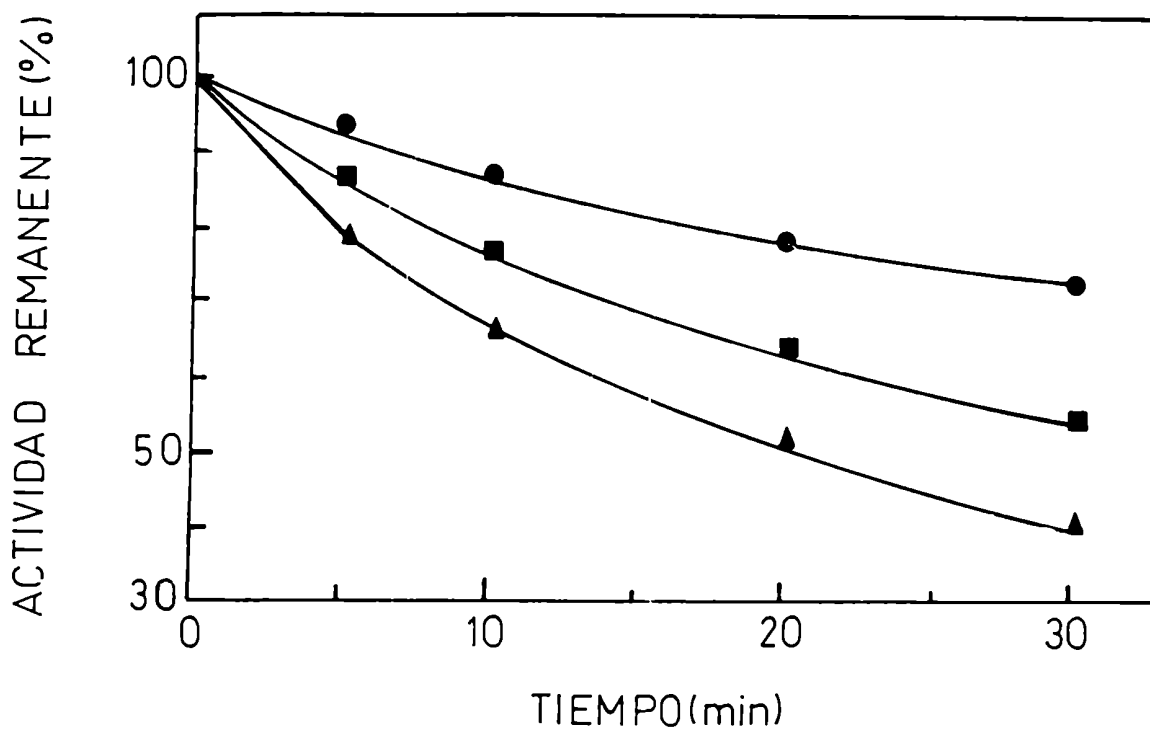


FIG.49: EFECTO DE LA CONCENTRACION Y DEL TIEMPO EN LA INACTIVACION POR CMC.

PBG-D (9,5 U/ml de mezcla de incubación) y CMC en las concentraciones indicadas se incubaron en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 6,2 a 20 C. A los tiempos señalados se retiraron alícuotas (50 μ l) a las que se adicionaron buffer y sustrato para la determinación de la actividad enzimática según se indica en Métodos. La actividad enzimática del control fue de 6,8 U/mg. Los valores graficados son promedios de tres experiencias. Concentraciones de CMC: 15 mM (●), 22 mM (■) y 44 mM (▲).

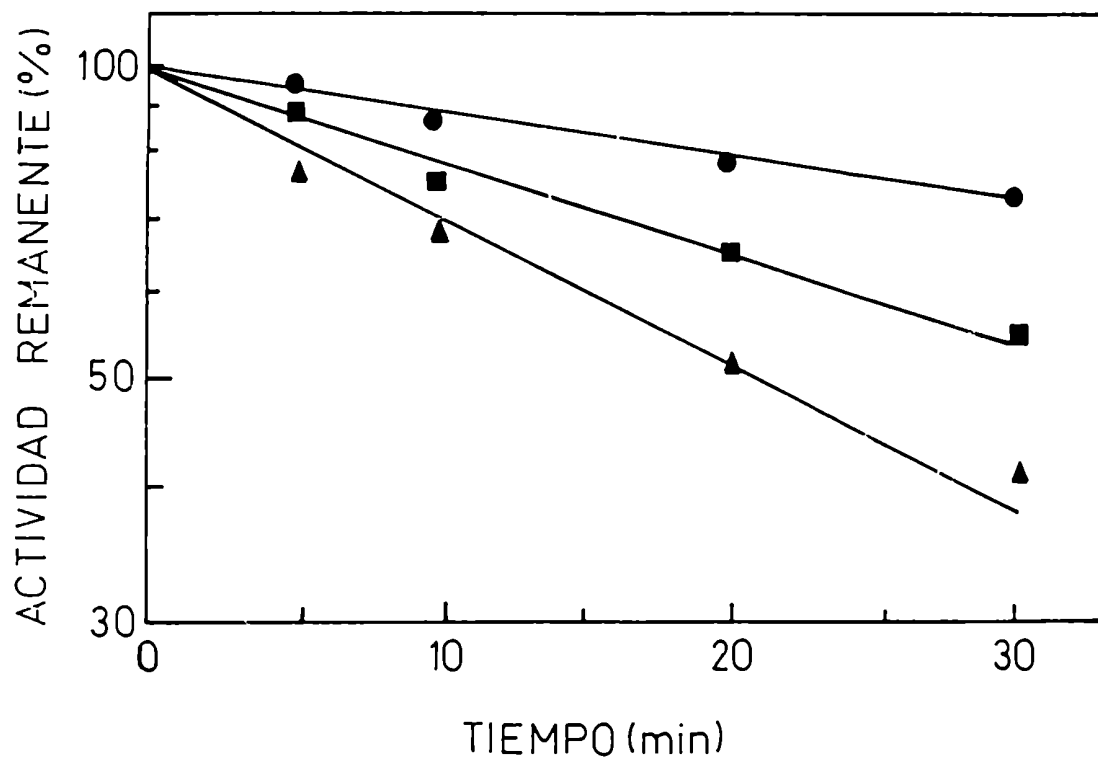


FIG.50: CINETICA DE LA INACTIVACION POR CMC.

Los datos graficados se obtuvieron a partir de los presentados en la Fig.49.

III.1.2.4.3 Efecto del amonio y de la hidroxilamina

Se estudió la interacción del ión amonio y la hidroxilamina con la enzima analizando su acción sobre el consumo de PBG y la formación de producto.

Para el amonio se ensayaron concentraciones de 10 a 200 mM que se incorporaron al medio de incubación estándar simultáneamente con el sustrato. En la Fig.51a se muestra que el efecto producido es dependiente de la concentración difiriendo su magnitud según se mida la formación de producto o el consumo de PBG, observándose valores de inhibición en el rango 24 a 57% y 13 a 43% respectivamente. Cuando se analizó el porcentaje de inhibición relativa entre ambos parámetros se obtuvieron valores mayores (10 a 15%) para la formación de producto a una concentración de amonio igual o mayor a 50 mM.

A los 120 min de incubación la actividad remanente para la mayor concentración de amonio ensayada fue de 43% para la formación de producto y de 57% para el consumo de sustrato.

La acción del amonio resultó también dependiente del tiempo de incubación, como se muestra en la Fig.51b, cuando se estudió a una concentración del efector igual a 200 mM. Se observó inhibición de la actividad, medida como formación del tetrapirrol (60%), hasta los 90 min y posteriormente una disminución de la inhibición, es decir una mayor formación de producto, sin alcanzar los valores del control al mayor tiempo ensayado (180 min).

Cuando se estudió el efecto de la hidroxilamina, se obtuvieron resultados similares a los del amonio aunque a concentraciones del reactivo aproximadamente un orden de magnitud menor, como se muestra en la Fig.52.

Estos resultados son concordantes con los informados para la PBG-D de otras fuentes y pueden explicarse suponiendo que la presencia del amonio, hidroxilamina u otras bases no alteran la velocidad de condensación de las moléculas de PBG, mientras que

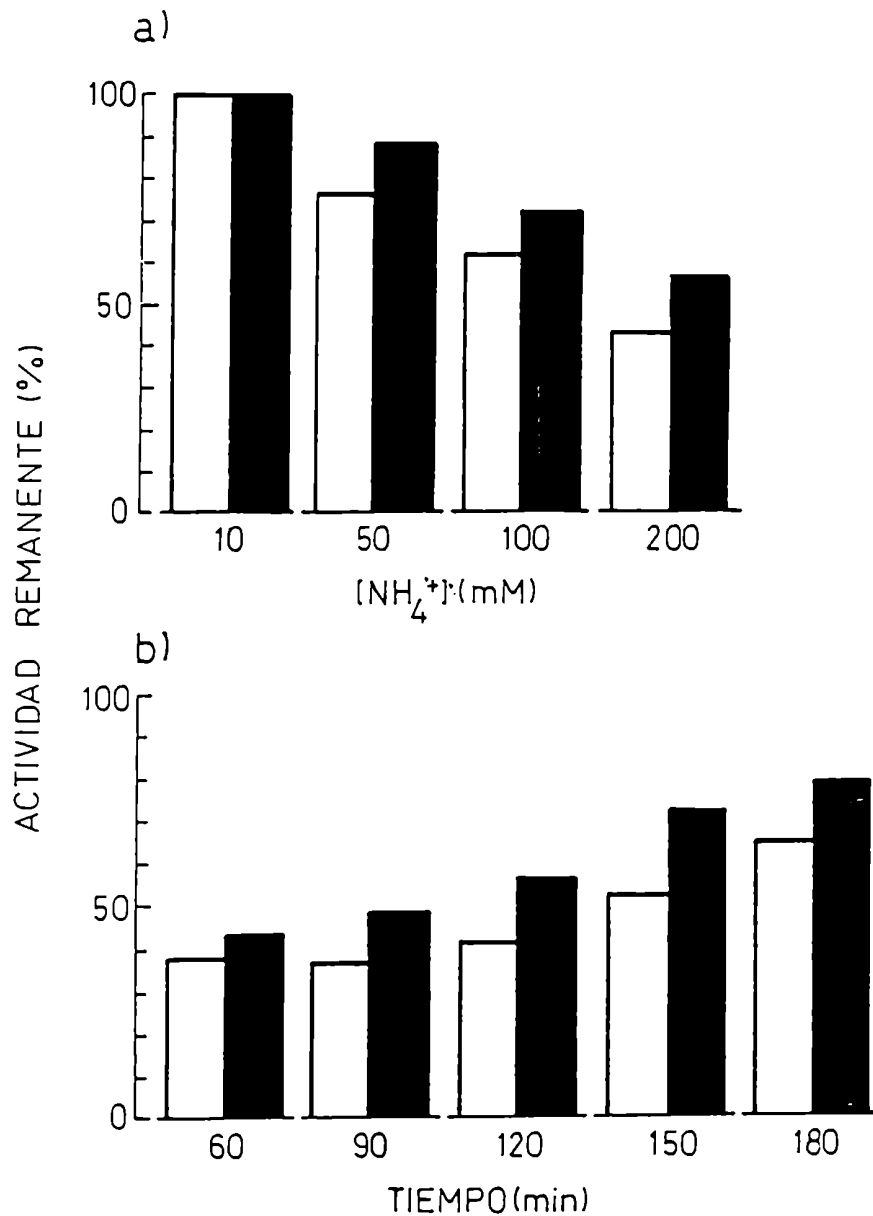


FIG. 51: EFECTO DEL AMONIO.

a) PBG-D (9,5 U/ml de mezcla de incubación), cantidades crecientes de sulfato de amonio y PBG (60 μ M) se incubaron en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,6. A los 120 min se determinó la cantidad de producto formado (□) y de sustrato consumido (■) según se indica en Métodos. La actividad del control fue de 6,8 nmoles de URD l/h.mg ó 28,1 nmoles de PBG consumido/h.mg. Los valores representados son promedios de tres experiencias. b) PBG-D (9,5 U/ml de mezcla de incubación), sulfato de amonio (100 mM) y PBG (60 μ M) se incubaron durante los tiempos indicados en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,6. La actividad residual se determinó midiendo el producto formado (□) o el sustrato consumido (■) según se explica en Métodos. La actividad de los controles se determinó incubando idénticas cantidades de enzima durante los tiempos indicados en ausencia de la sal de amonio. Los valores representados son promedios de tres experiencias.

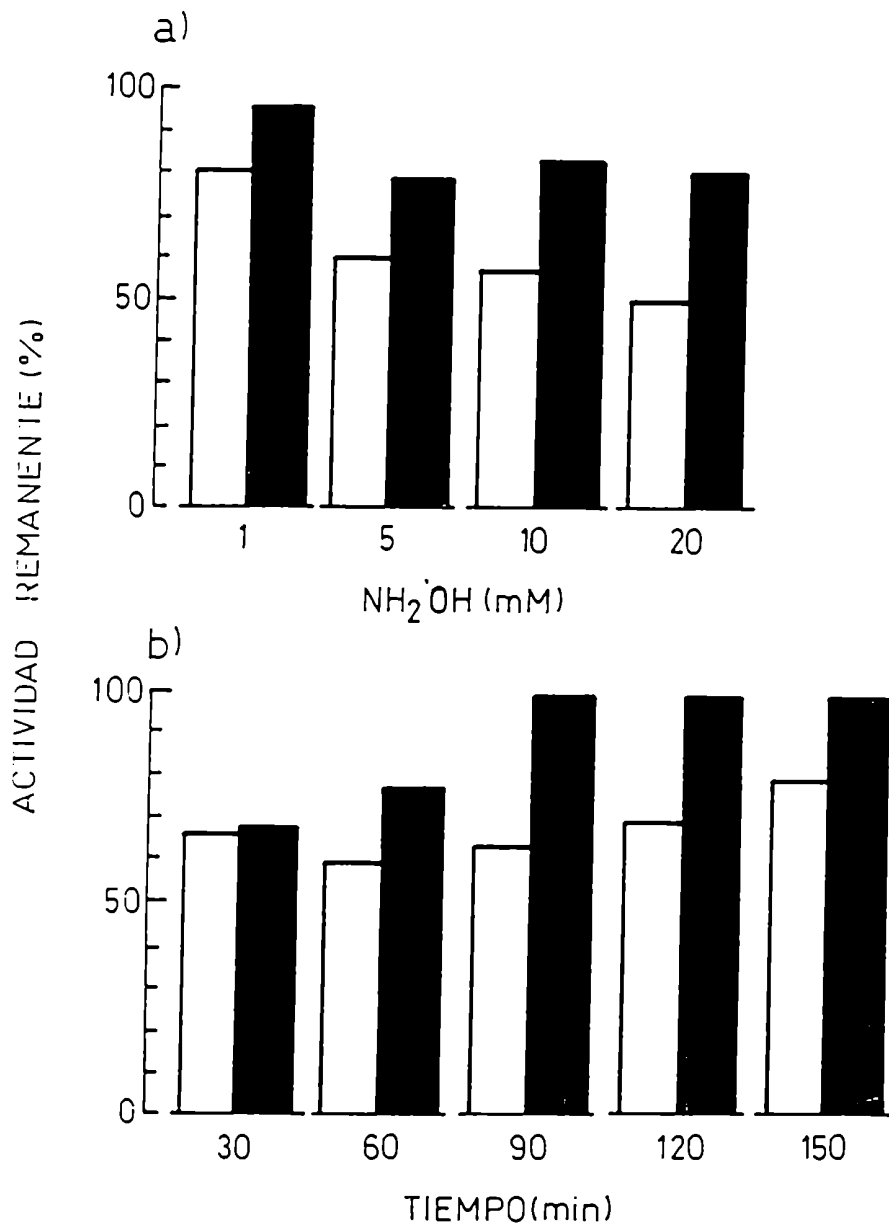


FIG.52: EFECTO DE LA HIDROXILAMINA.

a) PBG-D (9,5 U/ml de mezcla de incubación), cantidades crecientes de hidroxilamina y PBG (60 μ M) se incubaron en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,6. A los 60 min se determinó la cantidad de producto formado (\square) y de sustrato consumido (\blacksquare) según se indica en Métodos. La actividad del control fue de 6,8 nmoles de URO I/h.mg ó 28,1 nmoles de PBG consumido/h.mg. Los valores representados son promedios de tres experiencias. b) PBG-D (9,5 U/ml de mezcla de incubación) hidroxilamina (5 mM) y PBG (60 μ M) se incubaron durante los tiempos indicados en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,6. La actividad residual se determinó midiendo el producto formado (\square), o el sustrato consumido (\blacksquare) según se explica en Métodos. La actividad de los controles se determinó incubando idénticas cantidades de enzima durante los tiempos indicados en ausencia de la sal de amonio. Los valores representados son promedios de tres experiencias.

la velocidad de ciclización del tetrapirrol lineal disminuye significativamente acumulándose de ese modo pirroles no isomerizados lineales. Estos podrían liberarse de la enzima formando los aductos de las bases de los mono, di, tri y tetrapirroles, como ha sido propuesto anteriormente (314, 358, 360). Estos aductos fueron aislados y caracterizados por electroforesis de alto voltaje por Plusec y Bogorad (359). Sin embargo, se observan diferencias en los resultados obtenidos con cada inhibidor. Así, experimentos llevados a cabo a pH 8,5 con iones amonio parecen causar acumulación casi exclusiva del tetrapirrol abierto y URO I, mientras que en aquellos llevados a cabo con hidroxilamina se acumulan grandes cantidades de di y tripirroles, además del tetrapirrol y URO I (360).

Battersby y col. (94, 322) sugirieron un mecanismo de acción para la PBG-D según el cual la enzima liberaría al medio un intermediario inestable llamado azafulveno (Fig.12) que al reaccionar con el agua se transformaría en HMB, pero en presencia de bases nitrogenadas como las mencionadas podría convertirse en bilanos relativamente estables que se acumularían, pudiendo a tiempos de incubación largos, transformarse no enzimáticamente a URO I, lo que explicaría el aumento del rendimiento de producto a intervalos prolongados de incubación. Este grupo de investigadores, postuló además, que la diferencia del efecto obtenido con uno u otro nucleófilo dependía de su basicidad ya que a pH 8,25 la concentración de NH_3 en una solución 0,2 M de cloruro de amonio es bastante baja, mientras que en una de hidroxilamina, la especie preponderante es la base libre (322).

III.2 PBG-D DE ERITROCITOS HUMANOS

III.2.1 PURIFICACION

cumplimentar dos objetivos: a) la obtención de un anticuerpo monoespecífico que se utilizó en el análisis poblacional para evaluar la inmunorreactividad de la proteína enzimática en individuos portadores de PAI y sus familiares; b) su comparación con las enzimas hepáticas, especialmente la humana.

La aplicación del procedimiento de purificación descrito en Métodos permitió, luego de la electroforesis preparativa, la obtención de una preparación enzimática con una actividad específica de 1.200 U/mg, lo que representa respecto de la fuente de extracción -eritrocitos lisados- una purificación de 12.000 veces.

El grado de pureza de la enzima nativa se evaluó por electroforesis según se detalla en la sección II.2.4. Se obtuvo una única banda proteica ($R_f = 0,47 \pm 0,2$), que exhibió actividad catalítica cuando se realizó su detección en el gel. Cuando la misma se corrió en condiciones desnaturalizantes se observó una única banda proteica con una masa molecular de 40 kDa.

III.2.2 CARACTERIZACION INMUNOLOGICA

III.2.2.1 Análisis de la proteína purificada y caracterización del anticuerpo

Con la enzima purificada, según se indicó en el punto anterior, y mediante el esquema de inmunización descrito en la sección II.2.9.1 se obtuvo el anticuerpo anti-PBG-D eritrocitaria.

Como se aprecia en la Fig.53, el ensayo de inmunodifusión realizado según se describe en la sección II.2.9.2 mostró un solo arco de identidad entre la enzima pura y el lisado de eritrocitos cuando se realizó la tinción para proteínas, lo cual sugiere la pureza inmunológica de la proteína eritrocitaria y la especificidad del anticuerpo obtenido. Para estos ensayos se utilizó como anticuerpo la fracción

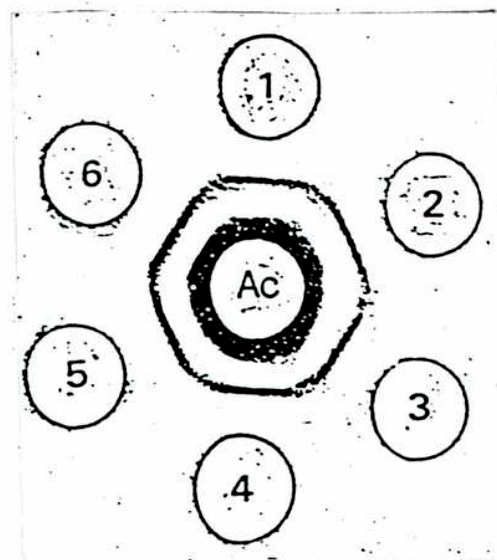


FIG. 53: ANALISIS INMUNOLOGICO DE LA ENZIMA PURIFICADA POR INMUNODIFUSION.

La inmunodifusión y el revelado de proteínas se realizaron según se indica en Métodos. El orificio central contenía 10 μ l del anticuerpo; los orificios 1, 3 y 5, 40 μ U provenientes de un lisado de glóbulos rojos humanos y los orificios 2, 4 y 6, 40 μ U de enzima purificada.

proveniente de la precipitación del antisuero total con sulfato de amonio al 40% dializada y redisuelta según se indicó en Métodos. En los estudios de valoración del anticuerpo obtenido, se utilizó como antígeno la enzima eritrocitaria purificada y se observó que la dilución 1:64 del anticuerpo permitió apreciar aún banda de precipitina (Fig.54). Diluciones iguales o mayores a 1:75 no pudieron detectarse por esta técnica. Por otra parte, cuando estos ensayos se realizaron con el antisuero total de conejo el título obtenido fue de 1:25.

III.2.2.2 Inmunotitulación de la proteína enzimática

En la Fig.55 se muestran las curvas obtenidas cuando se utilizó para la inmunotitulación enzima purificada o lisado de glóbulos rojos. El título obtenido en ambos casos, correspondiente a la dilución del anticuerpo que precipita un 50% de la actividad de la enzima, fue 1:85. Como puede observarse, las curvas obtenidas son coincidentes para ambas fracciones antigénicas. Estos resultados indican que en ambas muestras el antígeno exhibe la misma reactividad por el anticuerpo.

III.2.2.3 Estimación de la inmunoreactividad por electroinmunoensayo

Como puede apreciarse en la Fig.56, el electroinmunoensayo permitió la comparación entre muestras de glóbulos rojos lisados (orificio 5) y alícuotas que contenían cantidades conocidas de proteína catalítica pura (orificios 1 a 4). En la misma se observa que la aplicación de cantidades crecientes de PBG-D purificada (30-100 ng) produce incrementos proporcionales de las alturas de los picos, así como también ocurre si éstas se refieren a incrementos en la cantidad de unidades enzimáticas aplicadas (40-220 mU). Los límites inferiores que

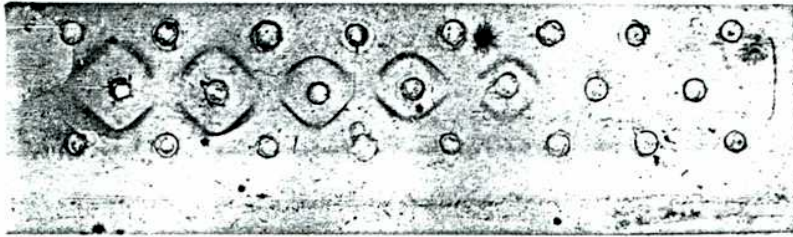


FIG.54: TITULO DEL ANTICUERPO anti-PBG-D POR IMMUNODIFUSION.

La técnica se realizó según se detalla en Métodos. Orificios superiores: contenían 46 μ U de PBG-D proveniente de un lisado de glóbulos rojos humanos. Orificios inferiores: contenían 42 μ U de PBG-D eritrocitaria purificada. Orificios centrales (de izq. a der.): contenían diluciones 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:75 del anticuerpo anti-PBG-D obtenido; orificio extremo der. contenía IgG de conejo inoculado con adyuvante solamente (control)

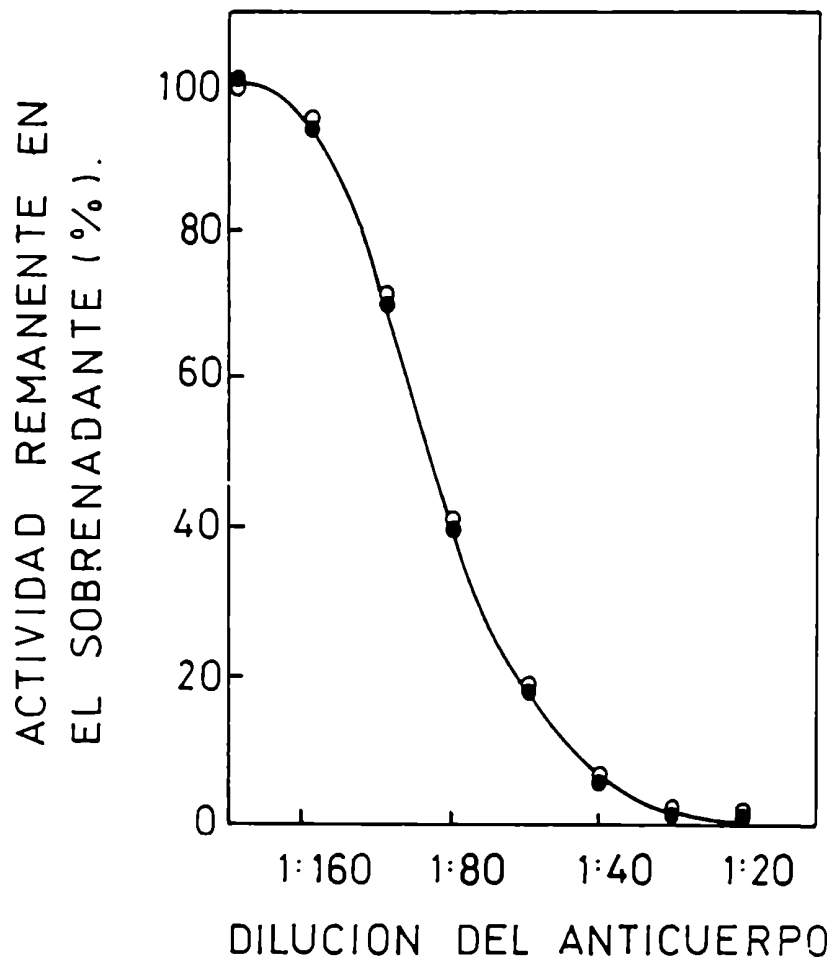


FIG. 55: CURVAS DE INMUNOTITULACION DE PB6-D ERITROCITARIA.

Para todos los ensayos se igualó la concentración proteica (80 mg/ml) y la actividad enzimática inicial (200 mU). El desarrollo de la técnica y la cuantificación de la actividad enzimática se realizó según se indica en Métodos. Los valores representados son promedios de tres determinaciones. Enzima purificada (●), lisado de glóbulos rojos (○).

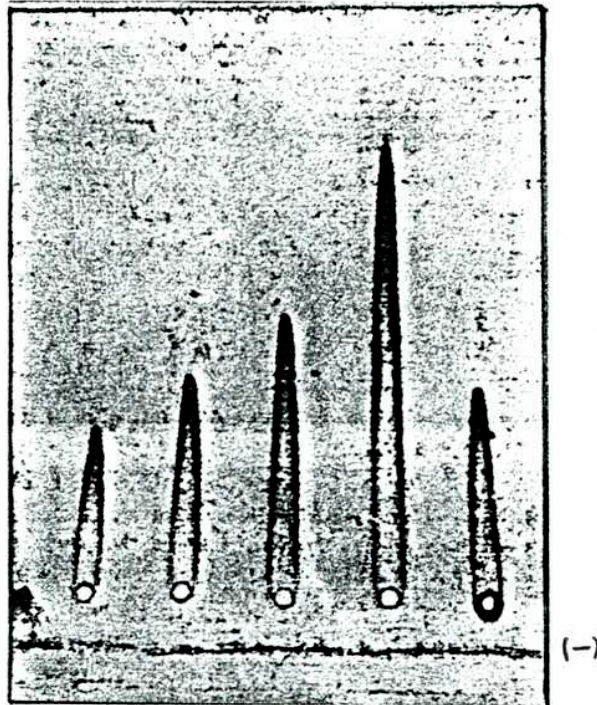


FIG.56: ELECTROINMUNOENSAYO DE PBG-D ERITROCITARIA.

La corrida y su revelado se llevaron a cabo según se especifica en Métodos. El gel contenía 5 μ l de anticuerpo/ ca^3 . Las muestras (10 μ l) fueron (de izq. a der.) 40 mU, 80 mU, 120 mU, 220 mU de enzima purificada y 74 mU correspondientes a un lisado de glóbulos rojos (7,5 U/ml de lisado).

podieron ser detectados en las condiciones del ensayo fueron de 15 ng de proteína y 20 mU de actividad enzimática.

Esta propiedad se utilizó en el análisis poblacional para la cuantificación de proteína inmunorreactiva en muestras de sangre de individuos controles y portadores del síndrome de PAI.

III.3 COMPARACION DE LA ENZIMA HEPATICA HUMANA CON LA ERITROCITARIA HUMANA Y LA HEPATICA DE RATA

En esta sección se consideran las propiedades cinéticas, hidrodinámicas y estructurales para una caracterización más detallada de cada una de las enzimas investigadas. El análisis de sus similitudes y/o diferencias permite evaluar comportamientos biológicos, establecer homología a través de especies, aportar datos sobre la evolución filogenética de esta proteína, así como indagar en la naturaleza de los grupos funcionales que participarían en el proceso catalítico.

III.3.1 PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS

En la Tabla XI se presentan los valores correspondientes a los diferentes parámetros fisico-químicos de las enzimas en estudio, eritrocitaria y hepática humanas y la hepática de rata.

III.3.1.1 Actividad basal

Las actividades basales medidas en tejido hepático de fuentes mamíferas tan diversas como humana y de rata, muestran valores significativamente mucho más bajos que en eritrocitos circulantes (aprox. 10 veces). Más interesante aún es el valor en tejido hepático humano (3,66 U/g tejido) que se constituye

TABLA XI: PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS.

PROPIEDAD	PBG-D		
	ERITROCITARIA HUMANA	HEPATICA HUMANA	HEPATICA DE RATA
a) ACTIVIDAD BASAL			
.Adulto (U/g de tejido)	37,5 ± 7,6*	3,66 ± 0,66	5,01 ± 0,50
.Adulto (U/mg de proteína)	0,094±0,018	0,026±0,004	0,036±0,006
.Neonato (U/mg de proteína)	0,260±0,058	0,080	0,216±0,030
b) PARAMETROS MOLECULARES E HIDRODINAMICOS.			
. PM mínimo	40.000	45.000	42.000
. PM (proteína nativa)	39.600	43.500	41.600
. $S_{20,w}$ (S)	3,4	3,6	3,5
. r_s (A)	26,5	27,5	27,0
. f/f_0	1,17	1,18	1,18
. pI			
. Adulto			
- Proteína parcialmente purificada	6,8;6,6;6,5 6,3;6,2 ^a .	5,8;5,5	4,9
- lisado de glóbulos rojos	6,3;6,0;5,7 5,5;5,3.	---	---
- fracción S_{n1} calentada	---	5,8;5,6	---
- homogenato calentado	---	---	4,9;4,8
. Feto			
- homogenato calentado	---	N.D.	5,8;5,5 5,3;4,8.
c) FUERZA IONICA			
. Picos de elución en DEAE-cel. (mM)	45, 60, 80 95, 110 ^a	85, 95, 105	65, 95 120, 145
d) PARAMETROS CINETICOS			
. $V_{máx}$ (U/mg)	1.200±150	30,5±2,8	36,2±6,8
. K_m (μ M)	6,3±1,5	3,6±0,3 (pH 7,5)	17±3
. N^o de recambio (seg^{-1}) $\times 10^3$	13,3	0,38	0,42
. pH óptimo	7,5	7,6	7,5
. E_a (kJ/mol)	37-50°C:104,6 50-58°C:146,4	25-50°C:86,6 50-65°C:46,9	25-45°C:62,8 45-55°C:108,8

* considerando que 1g de eritrocitos contiene 300 mg de Hb (229); U = nmol de URD 1/h.

^a Anderson y Desnick(331).

N.D. no determinado.

en el más bajo informado en la literatura (Tabla XI,a). Cabe destacar que células de procariotes (316) y eucariotes inferiores (322) muestran actividades dos órdenes de magnitud mayor (500-700 U/g peso húmedo), mientras que la actividad encontrada en reticulocitos es diez veces mayor que en eritrocitos (441). Estas diferencias reflejan posiblemente la función fisiológica inherente al tejido de origen, así en tejido eritroide, la actividad se relaciona con la síntesis de Hb en médula ósea y con el grado de maduración celular, siendo la medida en eritrocitos un resabio del proceso madurativo que se detecta en la sangre circulante.

Los valores tan bajos encontrados en tejido hepático son suficientes para satisfacer la demanda normal de síntesis de hemo, aún en individuos portadores de PAI quienes poseen una actividad de PBG-D disminuida al 50%. Sin embargo, en estos pacientes, cuando un requerimiento de hemo exacerbado destraba los mecanismos de control fisiológicos induciendo la enzima reguladora (ALA-S) y generando un aporte masivo de sustrato (PBG), la PBG-D hepática condicionada por esos bajos niveles deviene la enzima limitante del camino de los tetrapirroles, manifestándose la enfermedad. No ocurre lo mismo en tejido eritroide, ya que una disminución del 50% de su actividad en casos de PAI dejaría aún suficiente actividad para formar URO'geno y mantener una velocidad de síntesis de hemo compatible con sus necesidades.

Cuando se comparan las actividades específicas (por mg de proteína) de tejido hepático o eritrocitos de neonato respecto de las del adulto los datos revelan actividades más altas en todos ellos, aunque siempre se conserva la diferencia tisular. El hígado fetal de rata de 16 días presenta un nivel de actividad 20-24 veces mayor que el de la adulta alcanzando su valor máximo, para disminuir hasta el momento del nacimiento (5-7 veces mayor) y durante la primera semana de vida hasta alcanzar el valor del adulto.

En tejido neonato humano el valor resulta alrededor de tres veces el del adulto.

Cabe destacar que en el periodo fetal el hígado es un tejido hematopoyético, debiendo así satisfacer un mayor requerimiento de hemo y por ende de síntesis del tetrapirrol formado por la PBG-D.

III.3.1.2 Parámetros moleculares e hidrodinámicos

En ambos casos, para la proteína nativa o tratada con agentes desnaturalizantes se determinaron PM similares pero siempre algo mayores para las enzimas hepáticas respecto de la eritrocitaria. Los valores están comprendidos entre 36.000 y 45.000 para la eritrocitaria (331, 336) habiéndose informado valores más bajos (25.000) posiblemente como productos de proteólisis; y entre 41.000 y 45.000 para las hepáticas en este trabajo.

Sin embargo, la masa molecular derivada de estudios de secuenciación de cDNA es de 39.290 Da para la enzima hepática humana y 37.627 Da para la eritropoyética, siendo ambas idénticas excepto un trozo adicional de 17 residuos de aminoácidos en la zona amino-terminal de la hepática. Estos valores son menores que los hallados por todos los otros métodos ensayados, como permeación y electroforesis. Valores cercanos a 40.000 Da se han informado para PBG-D de procariotes (315, 316).

El hecho de que los valores de PM mínimo se correspondan con los de la proteína nativa indica una estructura monomérica para las PBG-D, cuyos parámetros hidrodinámicos ($s_{20,w}$, radio de Stokes, cociente friccional y ejes de la partícula) concuerdan con una proteína globular, tipo prolato. Los valores de los cocientes friccionales poco mayores que la unidad, implican partículas casi simétricas, siendo este cociente algo menor para la enzima eritrocitaria humana (Tabla XI,b).

Analizado el comportamiento de las distintas enzimas sometidas a isoelectroenfoque (Tabla XI,b) se hace evidente una remarcable diferencia tanto en el número de bandas enfocadas como en el valor de los pI determinados. Así, las formas moleculares múltiples halladas, representativas de la heterogeneidad de carga que poseen las proteínas hepáticas en extractos crudos o parcialmente purificados fueron siempre más ácidas, comprendidas en el rango 5,8 - 4,8, y se manifestaron en un número menor de bandas que las observadas para la eritrocitaria. Generalmente no se revelaron más de 1 ó 2 bandas (Tabla XI,b). La enzima hepática de rata presentó siempre los valores más ácidos (pI 4,9 - 4,8), sin embargo fue posible obtener hasta 4 bandas cuando se incubó la enzima hepática humana con su sustrato.

Los resultados aquí presentados, así como los informados en la literatura (340) para la enzima eritrocitaria revelan la presencia de 5 bandas, más básicas, que enfocan entre pH 6,3 y 5,3; aunque Anderson y Desnick (331) reportaron valores hasta 6,8 para esta enzima parcialmente purificada. La presencia de múltiples formas de PBG-D ha sido también informada por Miyagi y col. (329) quienes propusieron que la enzima eritrocitaria humana es un grupo de 6 isoenzimas con diferentes cargas eléctricas. Por otra parte, ensayos con extractos calentados de hígado fetal de rata (18 días) y neonatos coincidieron con el perfil observado en estudios con sangre de animales prepúberes o adultos.

III.3.1.3 Fuerza iónica

El comportamiento de fracciones con distinto grado de purificación sometidas a cromatografía de intercambio aniónico (DEAE-celulosa) con elución dependiente del parámetro fuerza iónica, de las enzimas hepáticas investigadas en este trabajo, se comparó con lo publicado para la enzima eritrocitaria

humana. Los perfiles de elución muestran diferencias significativas, no sólo en el número de picos detectados (Tabla XI,c) sino además en el rango de concentración del electrolito en el que lo hacen. Dependen también de la fracción estudiada. Así, la eritrocitaria parcialmente purificada presenta cinco picos que eluyen en el rango 45 - 110 mM de KCl, mientras que las hepáticas lo hacen a mayor fuerza iónica (85 - 145 mM KCl), no lográndose nunca detectar los 5 picos, estos resultados son consistentes con la mayor carga que dichas proteínas poseen al pH de la interacción iónica y que se relaciona con sus pI.

Diversas bandas son distinguibles también por electroforesis cuando las proteínas se corren en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes o por el isoelectroenfoque, como ya se señaló.

Todas estas bandas o picos, con cargas diferenciales se adscriben a formas múltiples de las proteínas que representan grados variables de polimerización del sustrato sobre la superficie de la enzima formando complejos covalentes ES_n ($n=0$ a 4), verdaderos intermediarios en el proceso catalítico. Estos resultados se ven apoyados además, por la demostración de una unión ordenada y secuencial desde A hasta D de las 4 unidades pirrónicas a la enzima (371, 375, 376). Merece destacarse que se convalida la existencia de estos intermediarios para las enzimas hepáticas humana y de rata, ratificando un mecanismo conservado a lo largo de la escala biológica.

III.3.1.4 Parámetros cinéticos

La comparación de los parámetros cinéticos característicos de una reacción enzimática muestra diferencias en los valores de K_m y particularmente en $V_{máx}$ (Tabla XI,d). Este último dato, notoriamente mayor (aprox. 40 veces) para la enzima eritrocitaria, expresaría la actividad que en eritrocitos

maduros queda como residual de la existente en células eritroblastoides como resultado del proceso de maduración continuo desde médula ósea hasta sangre periférica. Nunn y col. (421) han encontrado que la relación actividad versus proteína inmunoreactiva se mantiene constante, es decir que a medida que las células eritroides se transforman en tipos celulares menos activos en su capacidad biosintética hémica (reticulocitos a eritrocitos maduros), la PBG-D se degrada concomitantemente.

Las diferencias observadas en V_{\max} se mantienen cuando se calcula otro parámetro catalítico: la actividad molecular, molar o el número de recambio catalítico (Tabla XI,d).

Los valores de la constante cinética K_m expresan la concentración de sustrato a la cual se obtiene la mitad de la velocidad máxima y son por, ende, el reflejo de las concentraciones de sustrato que determinan la actividad real intracelular de las enzimas. Se asume que las concentraciones de PBG endógeno son bajas, premisa avalada por la excreción (trazas) y "clearance" libre de este metabolito.

Por otra parte y como ha sido informado por otros investigadores (321), si el valor de la constante intrínseca (k_2) en la ecuación de velocidad de la reacción para formación de producto (amonio), considerada como $v=k_2[ES]$, es bajo y por lo tanto despreciable, podemos inferir que la enzima hepática humana es dos veces más afín por su sustrato que la eritrocitaria.

El valor de pH al cual se obtiene máxima actividad (óptimo) a concentraciones saturantes de sustrato para las tres enzimas resulta ser prácticamente idéntico (Tabla IX,d), observándose una brusca caída en el lado ácido de la curva mientras que en el lado básico de la misma, su pendiente fue menos pronunciada. Otros autores informan valores similares para enzimas de origen animal (120) o más alcalino (pH 8) para la eritrocitaria humana (331). De estos experimentos se obtuvieron valores de pK_a cuyo significado se discutirá en la sección III.3.3.

El análisis comparativo de los estudios cinéticos de la dependencia de la actividad catalítica con la temperatura muestra una primera etapa de activación muy similar para las tres enzimas entre 25 y 50°C y luego un efecto diferencial ya que disminuye para la hepática humana y aumenta para la eritrocitaria (Tabla XI,d). Estos resultados convalidan el concepto conocido de que las PBG-D hasta ahora investigadas desde procariotes hasta eucariotes superiores, son todas termoestables, lo que reflejaría una estructura conservada a través del proceso evolutivo. Además, la enzima sería el resultado de una adaptación perfectamente organizada de la reacción de polimerización -que moléculas de PBG pueden llevar a cabo espontáneamente, con aumento de rendimiento por efecto de la temperatura- ajustada a un entorno que le exige funcionalidades distintas en células, tejidos, órganos y organismos diferenciados.

III.3.2 PROPIEDADES INMUNOLOGICAS

Los análisis inmunológicos realizados (Tabla XII) muestran que las PBG-D de eritrocitos e hígado humanos son inmunológicamente indistinguibles por inmunodifusión doble cuando se las enfrenta al anticuerpo generado contra la enzima eritrocitaria. En contraste, se observa una homología parcial entre la hepática humana y la de rata, dada por los arcos de inmunoprecipitación con espolón para la enzima de rata, cuando ambas son enfrentadas al anticuerpo generado contra la enzima animal. Estos datos convalidan una vez más la diferenciación entre especies y la homología entre isoenzimas de un mismo organismo, ambas citosólicas.

TABLA XII: ESPECIFICIDAD INMUNOLOGICA DE LA PBG-D.

CLASE	GENERO	TEJIDO	<u>ANTICUERPO anti-PBG-D</u>	
			HEPATICA DE RATA	ERITROCITARIA HUMANA
Mamífero	Rata	Hígado	+++	
	Hombre	Hígado	++	+++
		Eritrocitos		+++

III.3.3 EFECTO DE LIGANDOS SOBRE AMINOACIDOS DE PBG-D

Otro aspecto que trató de desarrollarse como aproximación al conocimiento de la naturaleza de los grupos funcionales localizados en el centro o sitio activo de las PBG-D constituyó el estudio de diversos ligandos en su interacción reversible o irreversible con grupos cargados de residuos aminoacídicos. Para ello se probaron algunos reactivos específicos que actúan como efectores o bien como modificadores químicos de dichos grupos, haciendo un análisis comparativo de las enzimas en estudio.

III.3.3.1 Reactivos tiólicicos

Con el fin de conocer el posible rol que pueden tener los grupos sulfhidrilos libres o implicados en uniones disulfuro en la actividad enzimática se estudió el efecto que ejercen diversos reactivos tiólicicos.

En la Tabla XIII se muestran los resultados obtenidos en

TABLA XIII: EFECTO DE REACTIVOS TIOLICOS.

La actividad de PBG-D se determinó en presencia del reactivo indicado en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,5 a 37°C según se indica en Métodos. Las actividades correspondientes a los ensayos controles fueron de 1,9 U/mg para la enzima eritrocitaria humana; 0,84 U/mg para la hepática humana y 1,2 U/mg para la hepática de rata. Los valores re presentan promedios de tres experiencias.

REACTIVO	CONCENTRACION (mM)	INHIBICION DE PBG-D (%)		
		ERITROCITARIA HUMANA	HEPATICA HUMANA	HEPATICA DE RATA
2-Mer	0,1	0	0	0
	0,5	15	8	10
	1,0	31	19	22
	10	46	36	40
	30	59	42	50
	50	61	48	53
	50*	60	48	52
DDT	0,1	0	0	0
	0,5	18	13	17
	1,0	42	33	39
	10	54	42	50
	30	67	49	65
	50	72	58	67
	50*	70	57	67
Cys	0,1	0	0	0
	0,5	11	4	8
	1,0	26	10	22
	10	34	18	30
	30	58	25	47
	50	60	32	49
	50*	59	31	50
GSH	0,1	0	0	0
	0,5	10	7	9
	1,0	24	17	19
	10	37	30	34
	30	56	39	45
	50	59	45	50
	50*	57	47	49
Cs-sC	0,1	5	0	1
	0,5	7	2	3
	1,0	10	7	9
	5	11	8	11
	50	27	20	25
	50*	27	21	25

* La enzima se preincubó con el reactivo durante 15 min a 37°C.

estudios cinéticos con agentes reductores como el 2-mercapto etanol (2-Mer), ditioneitol (DTT), cisteína (Cys) y glutatión reducido (GSH).

Del análisis de los datos surge que todos los reactivos ejercen su efecto clivante sólo a partir de concentraciones 0,5 mM en forma poco significativa (cerca al 10% en promedio). Esta acción resultó en una inhibición de la formación del producto, que aumenta con la concentración del reactivo en forma asintótica, no llegando a superar en algunos casos el 50% de inhibición ni aún a concentraciones 100 veces mayores (5×10^{-2} M. Tabla XIII). El DTT fue siempre el reactivo más efectivo. En todas estas experiencias, la enzima eritrocitaria mostró valores de inhibición mayores y por ende reveló ser la más sensible respecto de las hepáticas.

Preincubaciones de la enzima con los reactivos tiólicos a la mayor concentración utilizada, no modificaron los valores de la inhibición obtenida (ensayo*, Tabla XIII). Por otra parte, ensayos de preincubación de las enzimas con PBG, el sustrato biológico, durante 15 min a 0°C no mostraron variaciones en los niveles de inhibición correspondientes a la mayor concentración de los efectores. Estos resultados suponen que los reactivos tiólicos ejercen un efecto reductor sobre uniones disulfuros (-S-S-) presentes en las proteínas, formados posiblemente entre tioles vecinales o no, en su secuencia aminoacídica, cuya existencia sería importante para sus conformaciones.

Además, el hallazgo de un efecto inhibitorio no muy marcado a altas concentraciones podría sugerir que la ubicación de estos puentes no serían muy accesibles para los reactivos.

Para evaluar la importancia de grupos sulfhidrilo libres en el ciclo catalítico se utilizaron inhibidores reversibles o bloqueantes de dichos grupos. Cuando se estudió el efecto de agentes oxidantes como la cistina, se observó que concentraciones hasta 0,5 mM no ejercieron efecto alguno, y que

a 50 mM sólo producen una moderada acción inhibitoria ($\approx 24\%$) semejante para las tres enzimas (Tabla XIII). Preincubaciones con el sustrato no protegieron a las enzimas del mencionado efecto.

Estos datos demostrarían que los grupos -SH no serían de participación directa y rápida, sino que estarían más ocluidos en la estructura de la proteína, y por ende se los reconoce como lentos.

Para estudiar el efecto de bloqueantes de grupos sulfhidrilos se utilizaron los siguientes efectores p-mercuribenzoato (pMB), N-etilmaleimida (NEM), 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) y iodoacetamida (IAcNH₂) en un rango de concentraciones 10^{-5} a 10^{-2} M. Estos reactivos fueron incorporados a la mezcla de incubación.

En la Tabla XIV se muestran los resultados obtenidos para las tres enzimas.

El agente mercurial orgánico más específico para grupos -SH ensayado (pMB), ya a concentraciones 10^{-5} a 10^{-4} M, mostró un efecto inhibitorio marcado, alcanzando una inhibición casi total para la enzima eritrocitaria (95%) y algo menor para las hepáticas. A concentración 10^{-3} M se observó inactivación total de las enzimas por desnaturalización proteica. Ensayos de reversión de la inhibición producida por el mercurial se estudiaron con DTT. Concentraciones de 10^{-3} M ejercieron un efecto recuperatorio de la actividad del 56% para la enzima eritrocitaria y algo menor para las hepáticas (ensayos *, **, Tabla XIV). Debe recordarse que este agente actúa como inhibidor de la PBG-D, como se indicó anteriormente, y no obstante logra la reversión del efecto producido por el mercurial.

Los reactivos NEM y DTNB a 10^{-3} M ejercieron inactivaciones menos notables y la enzima eritrocitaria reveló ser en estos ensayos, menos sensible que las hepáticas humana y de rata.

TABLA XIV: EFECTO DE REACTIVOS DE GRUPOS SULFHIDRILOS.

Las enzimas se incubaron en presencia de sustrato y efector a las concentraciones indicadas en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7,5 a 37°C durante 30 min. El producto de la reacción se determinó según se señala en Métodos. Las actividades de los controles se indican en la Tabla XIII.

REACTIVO	CONCENTRACION (M)	INHIBICION DE PDG-D		
		ERITROCITARIA HUMANA	HEPATICA HUMANA	HEPATICA DE RATA
pMB	10 ⁻⁵	28	14	13
	10 ⁻⁴	95	60	61
	10 ⁻⁴ *	95	60	61
	10 ⁻⁴ **	42	38	42
NEM	10 ⁻⁵	5	31	22
	10 ⁻⁴	20	33	25
	10 ⁻³	21	41	30
	10 ⁻³ ***	25	50	36
DTNB	10 ⁻⁵	15	21	20
	10 ⁻⁴	20	25	22
	10 ⁻³	23	50	36
IACNH ₂	10 ⁻³	4	4	7
	10 ⁻²	7	8	9

* La enzima se preincubó con el reactivo durante 5 min a 37°C.

** La enzima se preincubó con el reactivo durante 5 min a 37°C y el ensayo de actividad se realizó en presencia de DTT 10⁻³ M.

*** La enzima se preincubó con PBS 0,2 mM durante 5 min a 0°C.

Cuando se ensayó el modificador IACNH₂ no se observó efecto significativo sobre ninguna de las enzimas, aún a concentración 10⁻² M.

Cuando se realizaron preincubaciones durante 5 min a 37°C de las enzimas con los reactivos bloqueantes a las mayores concentraciones no se vieron modificados los porcentajes de inhibición después de 30 min de incubación.

Incubaciones de las enzimas con PBG durante 5 min a 0°C previas al agregado de todos los efectores no modificaron el efecto inhibitorio en forma significativa, excepto para el caso

de NEM que produjo siempre valores algo mayores de inhibición.

Si se toman en cuenta todos estos resultados, es decir el hallazgo de que tanto reactivos o modificadores de grupos sulfhidrilos como de disulfuros muestran un efecto inhibitorio, así como la reversión por reactivos tióliccos de la inhibición por mercuriales, es posible inferir la participación de estos grupos en la actividad biológica de las PBG-D. Estudios con cDNA han demostrado que estas proteínas mamíferas poseen 4 residuos de cisteínas, 2 de ellos altamente conservados a lo largo de la escala biológica (390, 501) y 1 de estos últimos comprometido en su unión con un cofactor novel, un dipirrometano que sirve como pivote de anclaje para el proceso de tetrapolimerización del PBG (344, 345). Por lo tanto 3 residuos Cys aparecen como candidatos, con la posibilidad excluyente de la existencia de una única ligadura -S-S- y un grupo -SH libre, ambos de alguna forma comprometidos, no sólo en su actividad catalítica sino en su estabilidad y configuración dinámica.

Es posible entonces, especular que estructuralmente un par de grupos -SH correspondientes a 2 residuos de cisteínas, cercanos espacialmente, estuvieran comprometidos en una unión disulfuro conformando el centro activo, conjuntamente con un grupo sulfhidrilo libre que posibilitara su función. Además, que la participación de la estructura puente disulfuro primara en la conformación de la enzima nativa libre con acceso para el PBG, produciéndose una inhibición no total por acción de agentes reductores que favorecerían un cambio conformacional de la misma. Así, los reactivos reductores ensayados actuaron todos como inhibidores de la reacción, aunque no competitivamente ya que estos efectos no pudieron ser impedidos por el sustrato.

La presencia del grupo -SH libre reconocido sólo por reactivos potentes como el PMB o más hidrofóbicos como NEM y no por hidrofílicos como el IAcNH₂ sugeriría su oclusión en el centro activo y por ende su poca accesibilidad y quizás su

mayor exposición por preincubación con su sustrato.

El carácter sulfhidrílico de las PBG-D de organismos procariotes y de eucariotes inferiores, así como de hojas de espinaca y germen de trigo, ha sido informado por numerosos autores (105, 314, 315, 320, 324). Sin embargo no está aclarado el mecanismo por el cual estos grupos -SH participarían en el ciclo catalítico, aunque algunos proponen su interacción directa en el sitio activo (351).

III.3.3.2 Fosfato de Piridoxal

La existencia de un residuo de lisina comprometido en la catálisis enzimática en PBG-D de procariotes y eucariotes inferiores ha sido motivo de controversias (354, 355, 379). Para tratar de evaluar su participación en la PBG-D de las distintas fuentes se ha estudiado cinéticamente el efecto de un ligando específico para este aminoácido.

Para ello, las enzimas se incubaron a 0°C con fosfato de piridoxal (PPL) durante diferentes períodos, desde 30 seg a 15 min, a una concentración del efector de 6 mM (Fig.57), se observó una rápida disminución de la actividad enzimática hasta alcanzar un valor estacionario (65-80% de inhibición dependiendo de la enzima en estudio) alrededor de los 5 min de preincubación.

Cuando se utilizó en los ensayos una concentración menor de PPL (3 mM) se obtuvo un comportamiento, respecto del tiempo, similar al anteriormente descrito pero con valores de porcentajes de inhibición en el estado estacionario menores (45-55%).

Cuando se estudió el efecto del reactivo a un tiempo de preincubación constante (15 min a 0°C) en un rango de concentraciones 0,5 a 24 mM se observó, como se aprecia en la Fig.58, dependencia de la inhibición con la concentración de PPL, alcanzándose el valor de inhibición 50% a 2,5 mM del

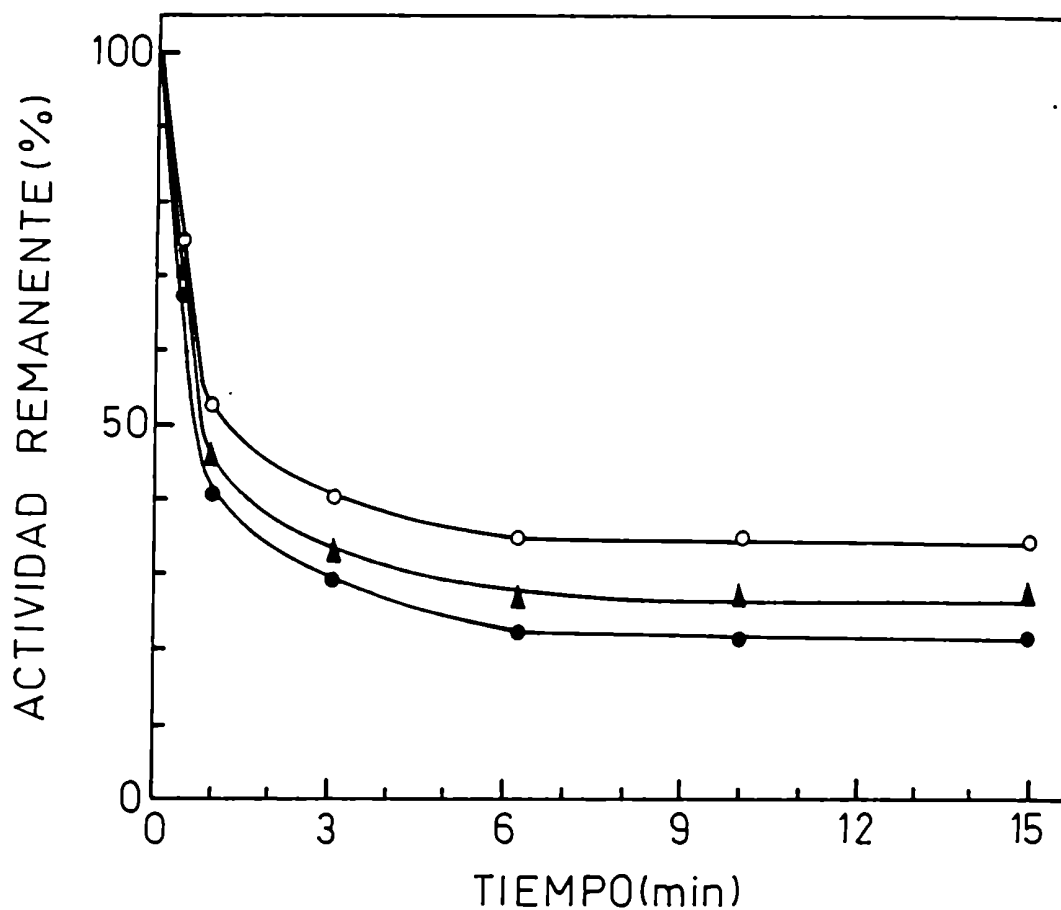


FIG. 57: EFECTO DEL TIEMPO DE PREINCUBACION EN LA INHIBICION POR PPL.

Las PBG-D eritrocitaria humana (○), hepática humana (●) y hepática de rata (▲) se incubaron en oscuridad con PPL 6 mM en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5 a 0°C. A los tiempos indicados se retiraron alícuotas de la mezcla en las que se determinó la actividad enzimática según se indica en Métodos. Los valores de los controles fueron 1,9 U/mg para la enzima eritrocitaria humana; 0,84 U/mg para la hepática humana y 1,2 U/mg para la hepática de rata.

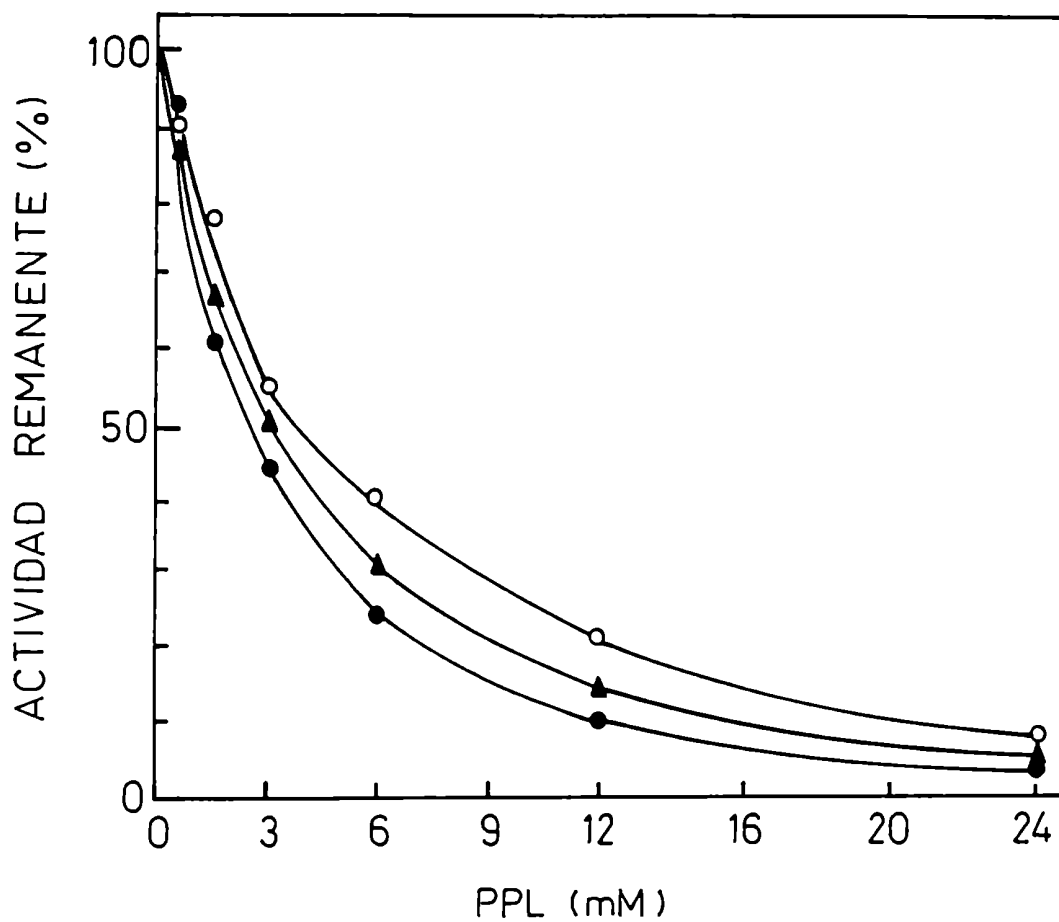


FIG.58: EFECTO DE LA CONCENTRACION EN LA INHIBICION POR PPL.

Las PBG-D eritrocitaria humana (o), hepática humana (●) y hepática de rata (▲) se incubaron en oscuridad con PPL en las concentraciones indicadas, en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,5 a 0°C durante 15 min. La actividad residual se ensayó según se indica en Métodos. Los valores de los controles se indican en la Fig.57.

efector para la enzima de hígado humano, 3,0 mM para la de hígado de rata y 3,5 mM para la de sangre humana. En los tres casos se alcanzó una inhibición casi total (90-95%) a la mayor concentración ensayada. Este comportamiento indicaría que dicha concentración del reactivo es suficiente para que las lisinas presentes en la proteína, comprometidas directamente con el proceso catalítico o indirectamente manteniendo una adecuada conformación del centro activo, reaccionen formando el complejo base de Schiff.

Cuando se realizaron ensayos de prueba con la enzima proveniente de E. gracilis a concentraciones de PPL 24 mM, mayores a las informadas por Hart y col. (354), se lograron inhibiciones similares a las obtenidas para las enzimas estudiadas en este trabajo (90%); si bien estos investigadores informaron que se alcanza un "plateau" (efecto máximo) en el valor de 35% de inhibición a concentraciones 2-3 mM del reactivo.

Incubaciones con el sustrato (0,2 mM) durante 15 min a 0°C, previas a la interacción con PPL (6 mM) a la misma temperatura durante 10 min, protegieron en un 10% la actividad de las enzimas.

El análisis de todos estos estudios sugieren la participación de grupos aminos de residuos de lisina en el mecanismo de reacción, aunque no comprometidos en la unión covalente del sustrato.

Las PBG-D de otras fuentes mostraron efectos similares de inhibición (357), aunque una mayor protección de la actividad enzimática por el PBG, permitiendo postular la presencia del aminoácido en el sitio activo.

III.3.3.3 Cationes

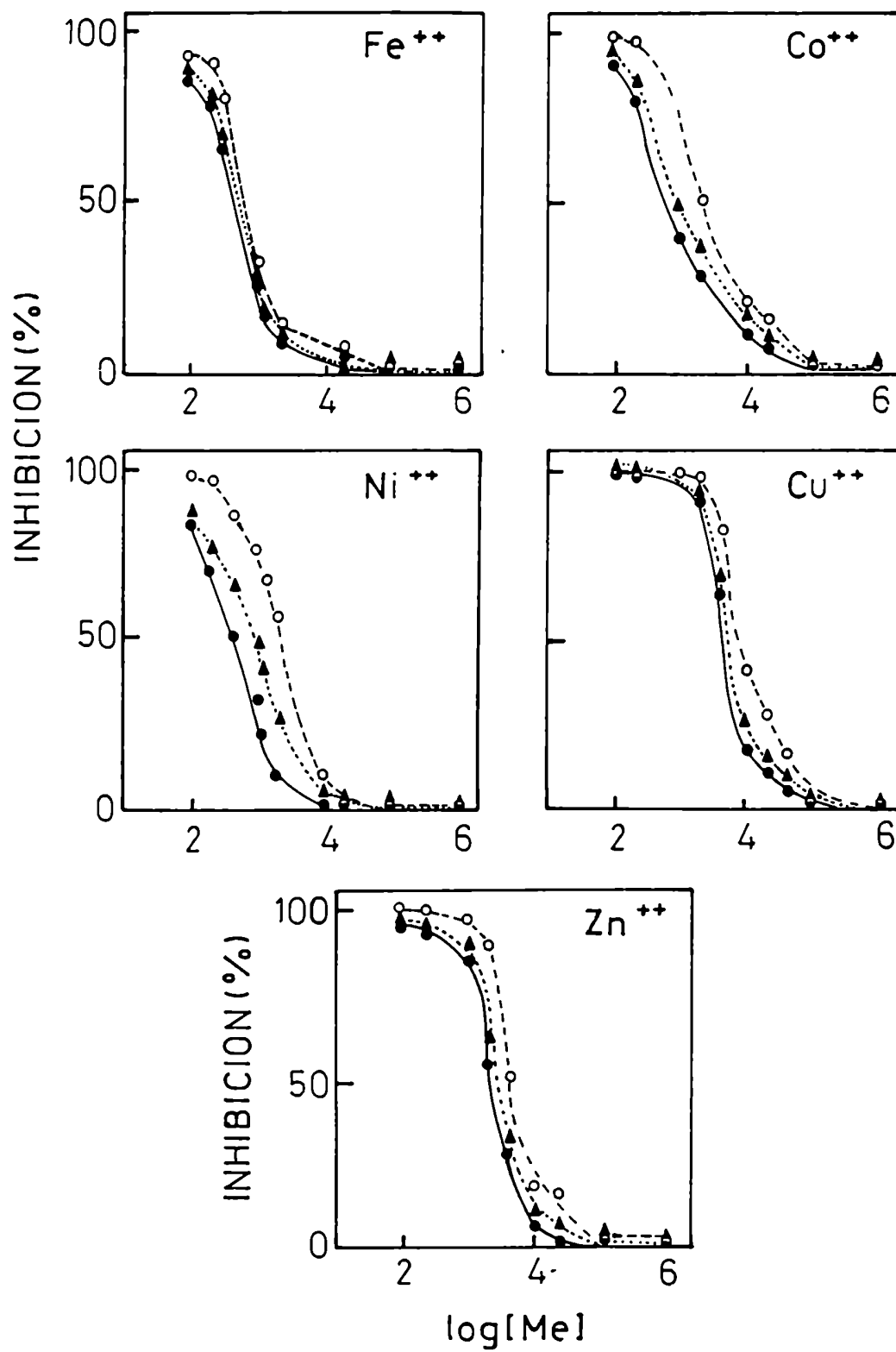
El efecto de los metales sobre el metabolismo del hemo ha sido objeto de un número grande de investigaciones (294). En

particular, es bien conocido el efecto tóxico de algunos de ellos sobre enzimas específicas, como lo es el del plomo sobre la ALA-D, conociéndose su interacción por estudios tanto "in vitro" como "in vivo", que han permitido aportar datos sobre el mecanismo de la reacción. Pareció interesante, entonces, realizar un estudio sistemático para caracterizar los efectos de una serie de cationes metálicos sobre las tres enzimas. La interacción enzima-metal se estudió como un fenómeno tiempo-independiente, estimándose el grado de inhibición producido sobre la formación del tetrapirrol y explorando además, en la naturaleza química de los 'grupos o átomos "ligandos" y "ligantes" que participan en forma preferencial en dicha interacción para poder explicar en parte, el comportamiento observado.

La inhibición de la actividad enzimática se analizó en un rango muy amplio de concentraciones del ión, adicionado a la mezcla de incubación, que varió entre 10^{-6} y 10^{-2} M para metales pesados, principalmente divalentes y que llegaron hasta 1,5 M para los más livianos. Las soluciones de sales ferrosas se prepararon y ensayaron en anaerobiosis.

En las figuras 59 y 60 se representa el grado de inhibición, expresado porcentualmente en función de la concentración del metal para elementos de las tres series de transición así como para el plomo. Como puede observarse para cada una de las enzimas se obtuvieron curvas de forma sigmoideal, características de una inhibición dependiente de la concentración del metal ensayado. De los datos obtenidos de cada una de las curvas se seleccionó la concentración molar del metal que producía el 50% de inhibición de la actividad catalítica y a ese valor expresado como: $-\log[\text{Me}]_{50}$ se lo denomina $p[\text{Me}]_{50}$ y se lo utiliza para el análisis de los resultados.

Como se puede apreciar en la Tabla XV, iones de metales livianos como Na^+ y K^+ no exhibieron efecto inhibitorio aún



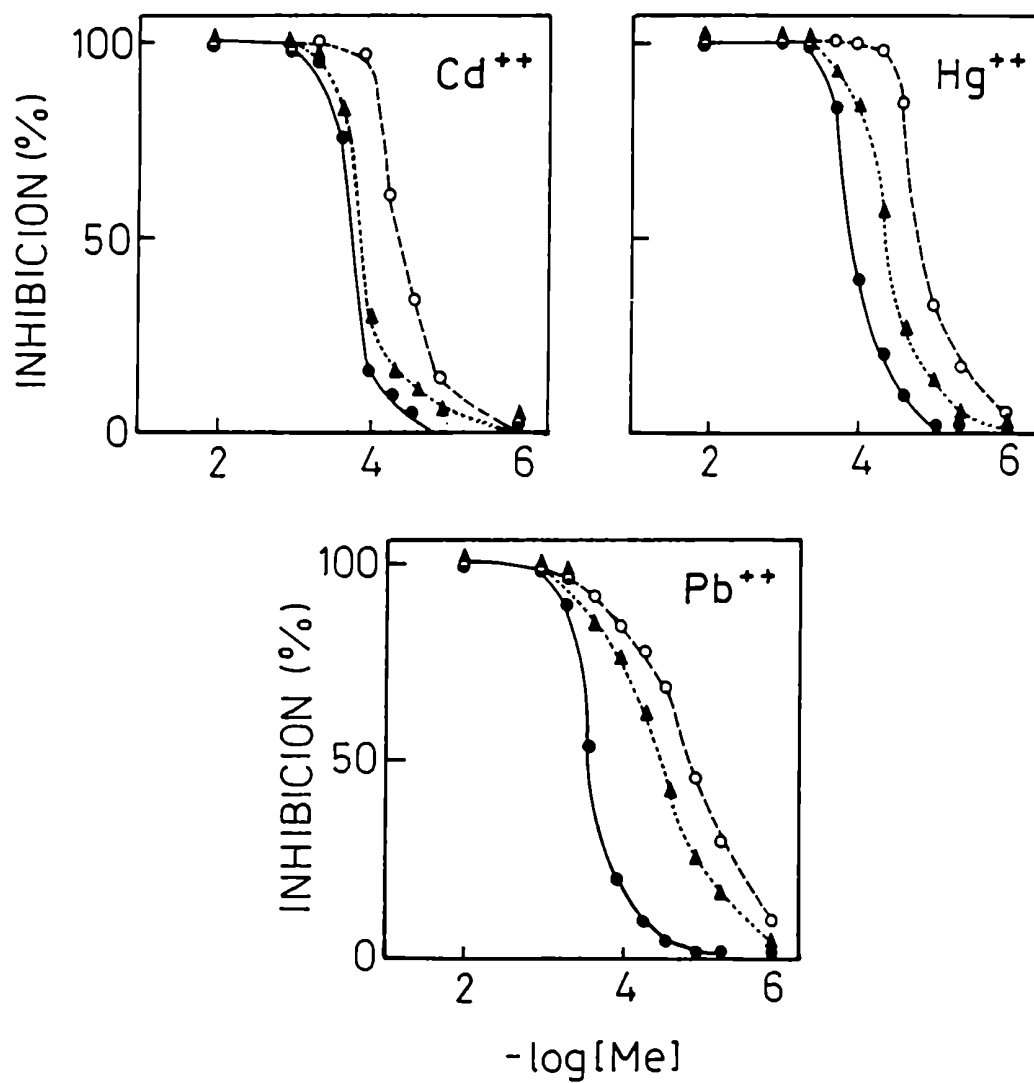


FIG.60: INHIBICION POR Cd^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} .

Las enzimas utilizadas y las condiciones de ensayo fueron idénticas a las descritas en la Fig.59.

a concentraciones 1 M, mientras que concentraciones de 1,5 M de los iones divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} no lograron la inhibición total de ninguna de las tres enzimas investigadas.

TABLA XV: INHIBICION POR METALES LIVIANOS

ION METALICO	RANGO DE CONCENTRACIONES	% INHIBICION
Na^+	$1,0 - 10^{-6}$ M	0
K^+	$1,0 - 10^{-6}$ M	0
Ca^{2+}	$1,5 - 5 \times 10^{-3}$ M	85 - 10
Mg^{2+}	$1,5 - 5 \times 10^{-3}$ M	75 - 0

Cuando se analizaron los valores de $p[\text{Me}]_{50}$ calculados, se encontró que los elementos de la primera serie de transición mostraron valores cercanos a $3,5 \pm 0,5$ para su interacción con la enzima eritrocitaria (Fig.61), obteniéndose valores siempre menores para ambas enzimas hepáticas. El valor más alto del parámetro $p[\text{Me}]_{50}$ se encontró para el más pesado de los metales post-transicionales ensayado, el plomo, seguido por el correspondiente al Hg^{2+} y Cd^{2+} y nuevamente resultó mayor para la enzima eritrocitaria. El análisis de estos datos muestra un comportamiento similar para las enzimas hepática humana y de rata, sin embargo se observa un grado diferencial de inhibición para metales correspondientes a un mismo período y aún para aquellos pertenecientes a un mismo grupo, por ejemplo el IIB (Fig.61).

Este comportamiento diferencial puede ser explicado considerando la existencia de isoformas tisulares y la

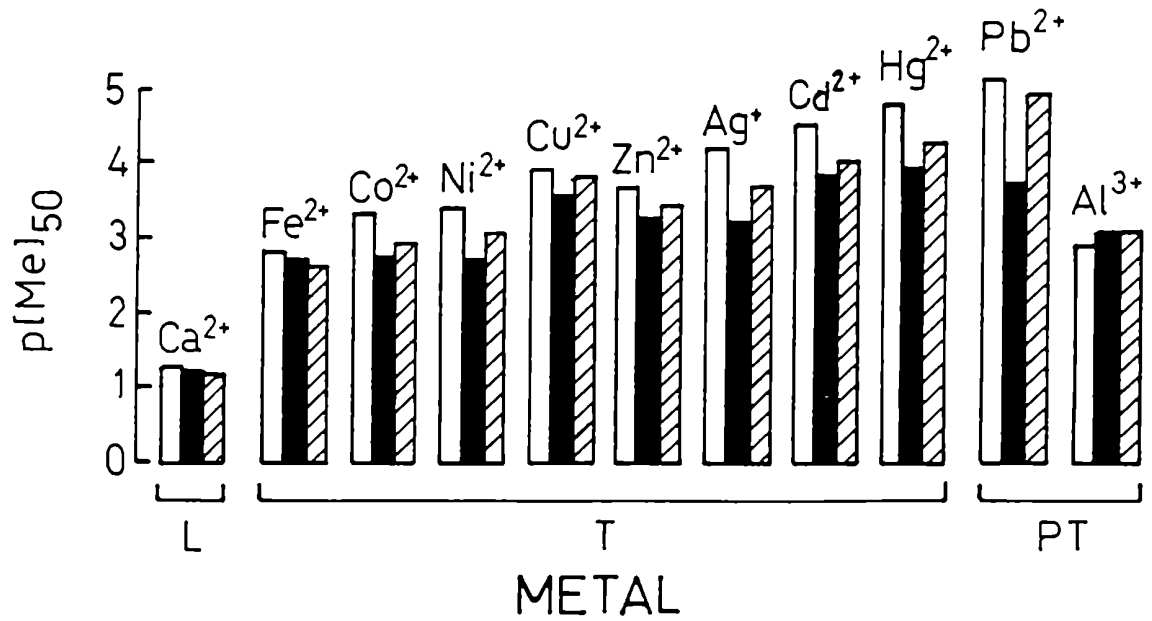


FIG.61: INHIBICION POR METALES LIVIANOS (L), DE TRANSICION (T) Y POST-TRANSICIONALES (PT).

Los valores son representados como el logaritmo decimal negativo de la concentración del metal que produce una inhibición de la actividad enzimática del 50% ($p[Me]_{50}$) versus los diferentes iones metálicos. PEG-D eritrocitaria humana (□), hepática humana (■) y hepática de rata (▨).

variabilidad entre especies.

La comparación de los valores de $p[Me]_{50}$ y consecuentemente de la capacidad inhibitoria de los metales estudiados reveló una marcada correlación con la serie de estabilidad propuesta por Irving y Williams (502)(Fig.62) según la cual para un ligante dado, la estabilidad de los complejos con iones metálicos divalentes -incluida la primera serie de transición- cumple el siguiente orden, $Ca^{2+} < Mg^{2+} < Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$, que depende de las inversas del radio iónico y del segundo potencial de ionización. Una tendencia similar se obtuvo para la 2da. y 3ra. serie de transición ($Cd^{2+} < Hg^{2+}$), observándose además que $Hg^{2+} < Pb^{2+}$ (Fig.62).

El análisis de los datos obtenidos se realizó según dos aproximaciones. En una de ellas se tomó en cuenta el modelo de ácidos y bases duros y blandos (ABDB) propuesto por Pearson (503), según el cual, los ligantes y los iones metálicos se clasifican en bases y ácidos duros o blandos respectivamente. Las especies duras (ácidos o bases) son en general pequeñas y ligeramente polarizables mientras que las blandas suelen ser más grandes y más polarizables. Se ha señalado una regla empírica sencilla para predecir la estabilidad de los complejos que se forman entre los ácidos y las bases: los ácidos duros prefieren unirse a las bases duras en tanto que los ácidos blandos a las bases blandas.

En la otra aproximación se consideró la teoría presentada por Klopman (504) en la cual se define el parámetro intrínseco de blandura ($E^\#$) que cuantifica y generaliza el tratamiento de la reactividad química, enfatizando la importancia de la electronegatividad del orbital de frontera del metal y la energía de desolvatación requerida para que un enlace pueda formarse.

Así, en la Tabla XVI se observa la correlación entre el parámetro $p[Me]_{50}$ de los metales ensayados, con el carácter

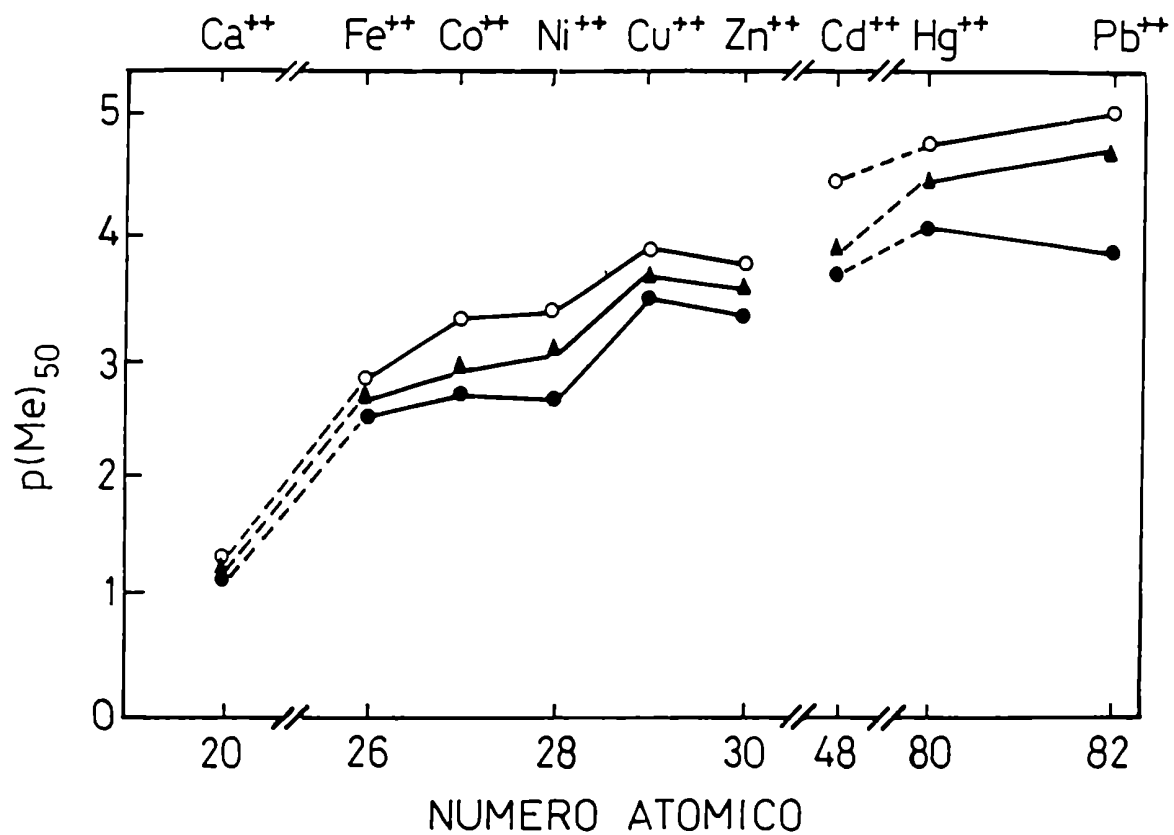


FIG.62: CORRELACION DE LA INHIBICION POR METALES DIVALENTES CON LA SERIE DE ESTABILIDAD DE IRVING-WILLIAMS.

$p[Me]_{50} = -\log[Me]$ que produce un 50% de inhibición de la actividad enzimática. PBG-D eritrocitaria humana (O), hepática humana (●) y hepática de rata (▲).

de ácido duro (D), blando (B) o intermedio (I) de los mismos, como también con el parámetro $E^\#$. De esta correlación se puede inferir, en general, que a medida que se incrementa el carácter blando o el valor negativo de $E^\#$ aumenta el $p [Me]_{50}$ y consecuentemente, la capacidad que el metal posee de inhibir la actividad enzimática de las distintas PBG-D. Como se observa en la Tabla XVI, es mayor para la eritrocitaria humana que para las hepáticas.

TABLA XVI: CORRELACION DE LA INHIBICION CON EL CARACTER DE BLANDURA SEGUN LAS TEORIAS DE PEARSON Y KLOPMAN

ION	CARACTER	$E^\#$ (eV)	$p [Me]_{50}$ DE PBG-D		
			ERITROCITARIA HUMANA	HEPATICA HUMANA	HEPATICA DE RATA
Hg ²⁺	B	- 4,64	4,8	3,9	4,3
Ag ⁺	B	- 2,82	4,2	3,2	3,5
Cd ²⁺	B	- 2,04	4,5	3,7	3,8
Cu ²⁺	B - I	- 0,55	3,9	3,5	3,7
Na ⁺	I	0	<1	<1	<1
Zn ²⁺	I	-	3,6	3,2	3,4
Ni ²⁺	I	0,29	3,4	2,6	3,0
Co ²⁺	I	-	3,3	2,7	2,9
Fe ²⁺	I	0,69	2,8	2,7	2,6
Fe ³⁺	D	2,22	2,6	2,6	2,6
Ca ²⁺	D	2,33	1,3	1,2	1,3
Mg ²⁺	D	2,42	1,1	1,0	1,0

B: BLANDO, I: INTERMEDIO, D: DURO, $E^\#$: BLANDURA.

Además, la Tabla XVII muestra que concentraciones tan altas como 1 M de ácidos duros como Ca^{2+} y Mg^{2+} , no son suficientes para inhibir totalmente a ninguna de las tres enzimas; sin embargo a medida que aumenta el carácter blando de los iones se requieren menores concentraciones para alcanzar el efecto máximo. Ácidos intermedios como Fe^{2+} , Co^{2+} y Cu^{2+} inhibieron la actividad de las enzimas eritrocitaria y hepáticas llegando al máximo valor en el rango de concentraciones $(0,5-10) \times 10^{-3}$ M, mientras que los iones más blandos ensayados (Ag^+ , Hg^{2+} y Cd^{2+}) lo hicieron a concentraciones 5×10^{-5} M y 5×10^{-4} M para las enzimas eritrocitaria y hepáticas respectivamente.

TABLA XVII: INHIBICION MAXIMA DE PBG-D POR ACIDOS DUROS Y BLANDOS

	ACIDO	BASE	Me
DUROS	Ca^{2+} ; Mg^{2+}	RCOO^-	$>1000 \text{ mM}^{\text{a,b,c}}$
INTERMEDIOS	Fe^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+}	RNH_2 , Im	$0,5-5 \text{ mM}^{\text{a}}$
	Cu^{2+} , Pb^{2+}	RNH_2 , RS^-	$1 - 10 \text{ mM}^{\text{b,c}}$
BLANDOS	Ag^+ , Hg^{2+} , Cd^{2+}	RS^- , $^-\text{SRS}^-$	$0,05 \text{ mM}^{\text{a}}$ $0,5 - \text{mM}^{\text{b,c}}$

a: PBG-D eritrocitaria humana; b: PBG-D hepática humana; c: PBG-D hepática de rata.
Im = Imidazol

Si se considera el carácter donador de electrones de los átomos interactuantes que pueden existir dentro de los sistemas biológicos y en este caso particular, las enzimas, los ligandos

casi exclusivamente implicados son el oxígeno, el nitrógeno y el azufre. De acuerdo al principio ABDB, éstos pueden ser ordenados de acuerdo a su blandura decreciente como $S > N > O$. Por lo tanto, los ácidos duros preferirán unirse al oxígeno o al nitrógeno, mientras que los ácidos blandos seleccionarán al azufre, y los intermedios formarán complejos con azufre más preferencialmente que con nitrógeno (505). Dentro de los intermedios, sin embargo, algunos ácidos como el Pb^{2+} muestran una preferencia exclusiva por el azufre sobre el nitrógeno. Esto puede sugerir que aminoácidos específicos estarían involucrados en el proceso catalítico.

La relación existente entre la concentración requerida para alcanzar la máxima inhibición producida por el ión metálico, su grado de blandura y la o las probables bases con las que forma complejos se muestra en la Tabla XVII. Se observa que hay una buena correlación entre el grado de blandura de los iones metálicos estudiados (ácidos) y la concentración que produce el máximo efecto inhibitorio. Si se tiene en cuenta la selectividad de los mismos por determinados ligandos (bases), según el principio de Pearson (503), los aminoácidos conteniendo grupos dadores como amino, imidazol o sulfuro -tales como lisina, histidina y cisteína- pueden estar involucrados en el proceso catalítico de las PBG-D estudiadas.

Examinando el conjunto de datos obtenidos, puede decirse que existe una notable correlación entre las enzimas respecto de su comportamiento como ligandos dadores frente a todos los iones metálicos ensayados. Es preciso recalcar que se observa este comportamiento similar, a pesar de la diferente cantidad de proteína usada en los ensayos de las enzimas de las diferentes fuentes, lo que sugeriría que un mecanismo común o conjunto de mecanismos comunes pueden estar involucrados en la actividad catalítica de estas enzimas y permiten postular el modelo de interacción presentado en la Fig.63.

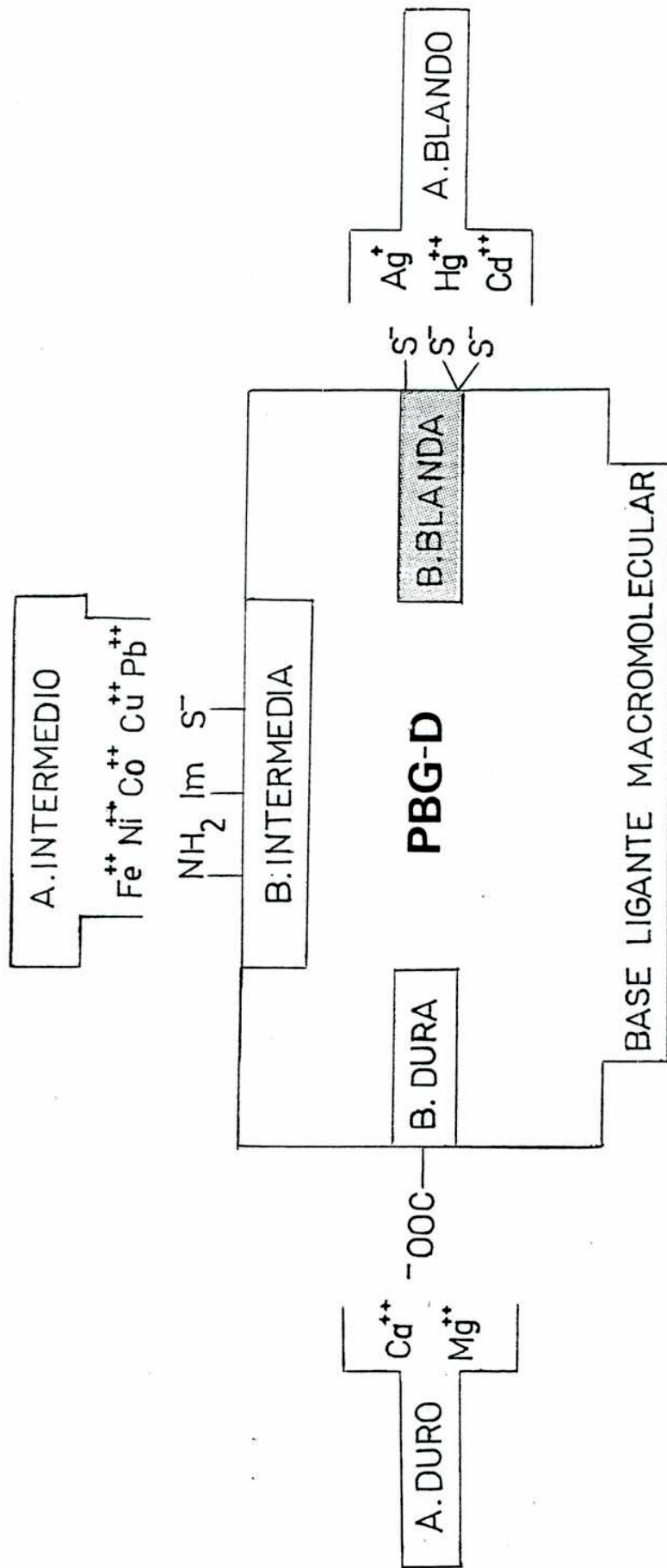


FIG. 63: MODELO DE INTERACCION DE LA PBG-D CON IONES METALICOS SEGUN EL PRINCIPIO DE ABDB.

A: acido; B: base; Im: imidazol.

III.3.4 NATURALEZA DE GRUPOS FUNCIONALES EN PBG-D

En la Tabla XVIII se presentan datos sobre el comportamiento característico de las diferentes enzimas que permiten aportar conocimientos sobre la naturaleza de grupos cargados de residuos aminoacídicos de las proteínas, su interacción con las moléculas de sustrato y su participación en la catálisis y/o configuración del centro activo.

En general, las variaciones de los valores de las constantes cinéticas con el pH han de reflejar las ionizaciones que podrían ocurrir en la enzima, en el sustrato y en el complejo enzima-sustrato, y en este caso en particular, también en las formas complejas intermedias capaces de unir sustrato o aquellas que han unido sustrato secuencialmente y liberan los productos. Así, valores de pK_{ES} y pK_E , constantes de ionización de los complejos ES o de E libre, pueden ser determinados mediante diferentes tipos de ecuaciones que linealizan las curvas clásicas de los parámetros cinéticos versus pH.

El análisis gráfico de los datos de $V_{máx}$ versus pH obtenidos para las enzimas permitió determinar los valores de pK , correspondientes a los complejos ES, que figuran en la Tabla XVIII, observándose una diferencia marcada entre la enzima hepática humana y la eritrocitaria. En particular, el efecto se hizo más notable en la zona alcalina, donde la curva para la enzima hepática mostró una pendiente más suave, obteniéndose un valor de pK_{ES} más alto. Estos tipos de curvas han sido obtenidas para la mayoría de las PBG-D de diversos organismos, tanto procariotes como eucariotes (316, 321, 332, 336) por lo que el análisis que se detalla a continuación es común para todas ellas.

El efecto del pH sobre una enzima como la PBG-D que utiliza cuatro moléculas del mismo sustrato, así como la obtención de valores de pK_{ES} por estudios de $V_{máx}$ y los de pK_E con el complemento de los valores de K_m a diferentes pH, han sido

discutidos exhaustivamente por Williams y col. (321),

TABLA XVIII: ACCION DE EFECTORES QUIMICOS.

EFECTOR	PBG-D		
	ERITROCITARIA HUMANA	HEPATICA HUMANA	HEPATICA DE RATA
H ⁺ (pKes)	7,15 - 8 ^a	7,35-8,9	7,1-8
CACIONES (p[Me]₅₀)*			
. divalentes (1a serie de trans.)	3,5	2,9	3,1
. Pb ²⁺	5,0	3,7	4,6
REACTIVOS de -SH Y -S-S- (% de inhibición)			
. pMB 0,1 mM	95	60	61
. NEM 1,0 mM	21	41	30
. RSH 50 mM	63	46	55
. Cs-sC 50 mM	27	20	25
PPL (p[PPL] ₅₀)**	2,4	2,5	2,6
FG (% de inhibición)			
. 7,8 mM, 1 min	N.D.	60	N.D.
WRK (% de inhibición)			
. 10 mM, 1 min	N.D.	60	N.D.

^a Saythe y Williams (336).

* p[Me]₅₀ = -log[Metal] que produce 50% de inhibición.

** p[PPL]₅₀ = -log[PLP] que produce 50% de inhibición.

N.D. no determinado.

Respecto de los valores de pKes, la falta de información existente hasta el momento acerca de la naturaleza de la etapa de velocidad limitante del proceso global, o la posibilidad de que ocurran ionizaciones equivalentes en la serie de reacciones

parciales hasta la obtención del último intermediario enzima-tetrapirrol, hace imposible atribuir los valores experimentales a alguna etapa en particular. De allí que se puedan sólo hacer aproximaciones sobre el tipo de grupos cargados participantes, como se verá más adelante.

Estos análisis publicados para diferentes PBG-D, como los desarrollados para las de este trabajo, en particular la hepática humana que se tomó como modelo, establecen que al menos dos grupos ionizables estarían involucrados en la catálisis

Así, para la enzima de E. gracilis (321) se informaron valores de pK_as 6,1 y 8,9; para la de bazo de rata de 7,4 y 8,8 (332); para la de E. coli de 7,07 y 7,92 (316); mientras que para la hepática humana se obtienen valores de 7,35 y 8,9.

Los datos obtenidos por Williams y col. (321, 332) mostraron una disminución en los valores de la relación $V_{m\acute{a}x}/K_m$ con el pH. del lado b \acute{a} sico de la curva de actividad, y han sido interpretados como la ausencia de un pK_a en la enzima libre (y/o formas ES que unen sustrato) o en el sustrato, y que corresponde al valor de 6,1 ó 7,4 obtenido. Si el efecto se debiera a la ionización de la parte S del complejo E-S, el pK_a de los grupos carboxilatos del PBG en su interacción con la enzima debería aumentar desde sus valores libres: 3,7 (acetato) ó 4,95 (propionato) hasta los valores observados (6,1; 7,4; 7,07; 7,35).

Evans y col. (317), por sus estudios con RMN de 3H en PBG-D de Rh. spheroides han supuesto, avalados por sus resultados, que valores altamente perturbados como los observados en estos pK por la interacción del sustrato con la proteína, serían compatibles con la formación de una unión iónica entre el grupo carboxilato de la cadena propiónica del PBG y un grupo b \acute{a} sico de la enzima. Este podría ser adscrito a un $\bar{E}-NH_2$ de lisina, un guanidino de arginina o un imidazol de histidina que participaría así de la conformación del centro

activo.

Si en cambio reflejara la ionización de la parte enzimática, su ausencia en el rango de pH ensayado podría deberse a que el pKa del grupo sería menor que 5 y correspondería posiblemente a un carboxilato de la E libre o bien a un grupo muy ocluido en la matriz proteica y que se hace accesible por un cambio conformacional por el sustrato.

Estos autores encontraron además que la dependencia de la relación $V_{\text{máx}}/K_m$ con el pH revela una única ionización a valor de pH 8,2 lo que reflejaría ionización en la E libre o en sus tres formas pirrónicas. Los valores muy cercanos obtenidos para los pK_as (8,8 en *E. gracilis*, y 8,9 en hígado humano) podrían sugerir ionización de grupos cargados en la enzima libre o en las formas ES capaces de unir sustrato donde los valores de pK_a se ven perturbados. Si se toma esta probabilidad como cierta, y se consideran los valores conocidos de los aminoácidos, se puede inferir que la cisteína (pK_a 8,3-8,6) sería el residuo que podría interactuar y por ende formar también parte del centro activo.

Con el fin de identificar más específicamente los posibles grupos hasta ahora propuestos se comparan los resultados obtenidos con reactivos más selectivos.

Como se ha indicado en la sección precedente (III.3.3) el uso de reactivos característicos de grupos tioles libres o unidos covalentemente ha permitido evaluar su posible participación en la estructura dinámica del centro activo. En la Tabla XVIII sólo se presentan ejemplos típicos de los efectos producidos por reactivos tiólicos específicos de ambos estados de oxidación del S (-2 y -1) así como los valores de la inhibición producida por iones metálicos que se caracterizan por una mayor interacción con la enzima, expresados como $p[\text{Me}]_{50}$.

El análisis de todos esos resultados llevó a la proposición presentada en la sección (III.3.3), donde se sugiere la

existencia en el centro activo de las PBG-D de una unión S-S que colaboraría en su conformación y de un grupo -SH libre no expuesto que se haría más accesible por un cambio conformacional, que es dable suponer ocurre por la adición secuencial de las cuatro moléculas pirrónicas.

Esta especulación estaría avalada por los resultados de Russell y Rockwell (351) quienes encuentran mayor inhibición de la PBG-D de germen de trigo, por preincubación con el sustrato, frente a reactivos inhibidores de sulfhidrilos y los de Warren y Jordan (379) quienes encontraron poca inactivación con la enzima nativa, pero sí un remarcado efecto (60-100%), tiempo dependiente, con los complejos intermediarios E-S, siendo más rápida la acción para la enzima con mayor número de moléculas de PBG unidas, i.e. $E \leftarrow ES \leftarrow ES_2 \leftarrow ES_3$.

En ambos casos, así como por los resultados de este trabajo, se propone que la adición de PBG causaría un cambio conformacional de las PBG-D que conduciría a la exposición de grupos sulfhidrilos previamente ocluidos en la enzima nativa.

Por otra parte, Rooij y col. (335) informaron que corridas electroforéticas en SDS-PAGE de PBG-D eritrocitaria humana purificada revelan dos bandas proteicas, una con menor y otra con mayor intensidad, con sólo una pequeña diferencia de PM: 40.900 y 41.500 respectivamente. Ambas bandas invierten su ubicación por la presencia de un agente reductor tiólico (DTT) agregado a la corrida. Aunque desconocen su significado, el efecto del DTT se corresponde con una diferencia en el estado de reducción de uniones disulfuro (-S-S-) en la PBG-D.

La remarcable correlación obtenida para las tres enzimas en la interacción de iones metálicos con grupos especiales de las mismas (Fig.63) y que implica un comportamiento similar (ligandos-ligante) aunque diferencial en sus valores absolutos -expresados por sus valores $p [Me]_{50}$ - (Tabla XV) sugiere que un mecanismo o una serie de mecanismos comunes podrían operar en las isoenzimas humanas y en la de rata. Es posible suponer

entonces que el mecanismo participante involucrado es la coordinación de los iones metálicos con sitios donores selectivos (S,N,O) necesarios para dar una estructura espacial que asegure máxima actividad. Siendo todos estos resultados obtenidos "in vitro", separadamente, e imaginando a todos los donores actuando simultáneamente como poco probable, uno puede estar tentado a acotar el número de ellos, considerando sólo a los donores de mayor capacidad de unión con los ligandos más específicos, es decir más inhibitorios. Con estas hipótesis, los resultados presentados muestran que la cisteína o cisteínas cercanas espacialmente serían las más favorecidas (Fig.63, zona sombreada).

El hecho que grupos cargados estén presentes tanto en el sustrato, que posee dos carboxilatos (pKa 3,7 y 4,95) y un amino (pKa 10,1) en su estructura, como en la enzima que tiene un número considerable de residuos aminoácidos con carga, permiten explorar en la búsqueda de posibles interacciones que consideren a estos grupos en la unión del sustrato y la catálisis. De allí que muchos investigadores, con diferentes PBG-D, hayan aportado datos a este conocimiento.

En la tabla XVIII se presentan sólo resultados ya analizados, que indican algunas de estas posibles interacciones.

El PFL ha sido implicado por varios investigadores (354, 357) como esencial para el mecanismo de la reacción. Recientemente, Miller y col. (355) han informado que dos lisinas de la PBG-D de E.coli, conservadas evolutivamente, se modifican preferencialmente y podrían integrar el sitio activo.

Los resultados obtenidos con la enzima hepática humana y modificadores químicos específicos para aminoácidos, aunque con diferencias, avalan los informes presentados por otros grupos de investigación (324, 340, 356, 357) sobre la participación o no de ellos en el proceso catalítico global. Así, modificadores para: a) histidina, no mostraron efecto alguno y por lo tanto puede ser descartado; b) arginina como fenilgloxal y c) grupos

carboxilatos como el reactivo específico de Woodward, mostraron una marcada y rápida acción inhibitoria.

El rol de residuos de argininas en la unión de tetrapirroles ha sido bien documentado para globinas y proteínas que unen grupos hemo relacionados, así como en la ferroquelatasa cuyo sustrato es un tetrapirrol, implicando siempre una interacción par iónica con grupos carboxilatos. Mientras que los valores de pKa obtenidos para diferentes PBG-D implicarían la participación de grupos carboxilatos, aunque muy modificados por su entorno.

Es también conocido que otras proteínas mantienen su grupo prostético hemo unido a la proteína por medio de una cisteína, de allí que no sea sorprendente su utilización por las PBG-D que asegura así una direccionalidad a su reacción catalítica.

Todo el cúmulo de resultados aportados por la literatura y por este trabajo permiten proponer el siguiente modelo para las PBG-D (Fig.64), teniendo presente que las enzimas como entidades moleculares orgánicas derivan su función biológica enteramente de su estructura espacial química no estática, sino dinámica.

III.4 ANALISIS POBLACIONAL

III.4.1 DIAGNOSTICO

Como se ha explicitado en la introducción (sección I.4.2) los portadores del síndrome porfirico pueden llevar su alteración génica sin llegar a su manifestación clínica. Sin embargo, cuando ocurre su eclosión es necesario determinar claramente su existencia en los posibles portadores para prevenir la exacerbación de los síntomas provocados por el uso incorrecto de drogas, en su mayoría porfirinogénicas, o diferenciarlo de otras enfermedades con signos semejantes. Por

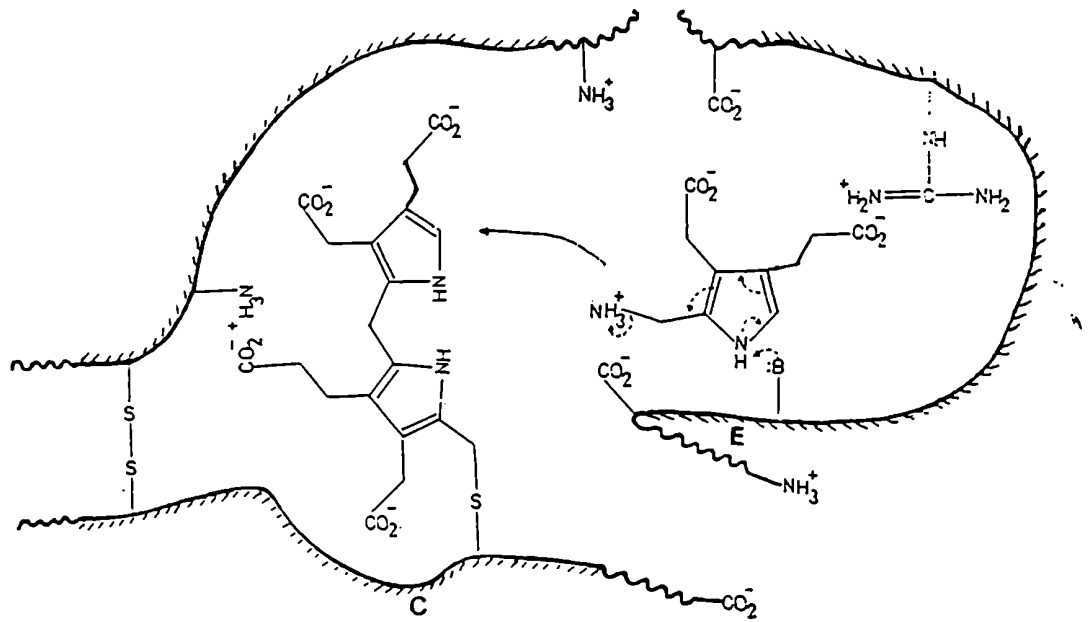


FIG. 54: MODELO PARA EL CENTRO ACTIVO DE LA PPS-D.

E: Sitio de entrada; C: Sitio de unión al CPMC y polimerización catalítica; B: base nucleofílica.

otra parte, el reconocimiento de los portadores silenciosos mediante estudios cada vez más específicos y en permanente desarrollo permite a la medicina preventiva aplicar modalidades terapéuticas que favorecen y/o posibilitan una mejor calidad de vida, previniendo la manifestación y/o exacerbación de esta patología.

Con estos objetivos, el análisis poblacional de PAI con fines diagnósticos comprendió, desde el punto de vista bioquímico, los estudios con los resultados que se desarrollan a continuación:

III.4.1.1 Metabolitos hémicos

Para detectar la presencia de intermediarios del camino biosintético del hemo, en cantidades alteradas, se realizaron diversos ensayos mediante técnicas rápidas como se indica en Métodos (sección II.2.10).

En la Tabla XIX se muestran los resultados correspondientes a los ensayos cualitativos que se realizaron en individuos con PAI en estadios de crisis, remisión y latencia.

TABLA XIX: ANALISIS CUALITATIVO DE METABOLITOS HEMICOS EN PAI

ESTADIO	SANGRE		ORINA		HECES
	PORFIRINAS	PBG	PORFIRINAS	PBG	PORFIRINAS
CRISIS	N	+++	++	++++	+
REMISION	N	++	+	++	N a +
LATENCIA	N	N	N	N	N

N = normal, + = arriba de lo normal, ++ = moderadamente incrementado, +++ y ++++ = muy incrementado

Se quiere destacar que este tipo de metodología resulta muy adecuada para los casos de crisis en los que la presencia de síntomas clínicos, a veces confusos, requiere la detección rápida de metabolitos hémicos, especialmente PBG, para descartar otras patologías. Como se sabe, la presencia de PBG elevado es un índice muy claro del síndrome porfírico pero no concluyente de PAI, ya que otras porfirias agudas también lo presentan, de allí la necesidad de ensayos más específicos.

En la Tabla XX se presentan los resultados de los ensayos cuantitativos de metabolitos hémicos, realizados en individuos controles y portadores de PAI silenciosos y manifiestos. El análisis de los datos demuestra que los metabolitos ALA y PBG presentan el mayor aumento respecto de los controles, pudiendo alcanzar en estadios de crisis severas, valores en orina de 85 a 100 mg y 135 a 250 mg diarios respectivamente, en los pacientes estudiados. En estos casos se observa un aumento de las porfirinas excretadas especialmente en orina, evidenciando la cromatografía en placa delgada de sus esteres metílicos, altos porcentajes de URO I (30% de la fracción URO) debido a la condensación no enzimática del PBG.

III.4.1.2 Actividad eritrocitaria de PBG-D

Como se ha señalado, la PBG-D es la enzima involucrada en la PAI, y su determinación en sangre periférica permitió avanzar con mayor certeza en el diagnóstico de la misma, ya que en la mayoría de los casos establece sin dudas, la falla génica.

Por lo tanto, se ha dosado la actividad de PBG-D eritrocitaria en individuos portadores y pacientes relacionados, así como en individuos sanos para obtener el valor promedio de la población control en Argentina. Se ha obtenido para portadores porfíricos un valor promedio de $16,3 \pm 3,3$ U/ml GR, con un rango de valores comprendidos entre

TABLA XX: ANALISIS CUANTITATIVO DE METABOLITOS HELMICOS EN PAI.

INDIVIDUOS	ORINA				HECES		SANGRE	
	ALA mg/d	PBG mg/d	URO ug/d	COPRO ug/d	PORFIRINAS ug/g p.s.	ALA ug/dl*	PBG ug/dl*	
PORTADORES MANIFIESTOS								
. crisis n=25	23-100	49-250	372-1260	248-840	25-185	35-70	70-130	
. asinto-								
maticos n=30	4-25	9-50	30-60	250-350	0-50	10-30	20-60	
PORTADORES LATENTES n=28	1-4	0-2	0-30	0-220	0-50	0-10	2-4	
CONTROLES n=40	0-4	0-2	0-30	0-220	0-50	0-10	0-4	

p.s. = peso seco; †: dl de suero

8,2 y 29,1 U/ml GR. Como muestra la Tabla XXI para individuos normales el valor promedio de la actividad es aproximadamente el doble ($37,9 \pm 7,7$ U/ml GR), sin embargo, el rango obtenido evidencia un cierto grado de superposición en los valores basales de actividad entre individuos controles y portadores.

TABLA XXI: ACTIVIDAD BASAL DE PBG-D ERITROCITARIA

INDIVIDUOS	PBG-D (U*/ml GR)	
	rango	$\bar{X} \pm SD$
PORTADORES (n=70)	8,2 - 29,1	16,3 \pm 3,3
CONTROLES (n=90)	23,0 - 52,1	37,9 \pm 7,7

*U = nanoles URO I/h.

Este hecho ya señalado por otros investigadores (437, 439) dificulta en algunos casos (8%) el diagnóstico certero de eventuales portadores silenciosos o latentes en estudios familiares y ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas que tienden a analizar la falla a nivel molecular.

En la Fig.65 puede apreciarse un estudio típico familiar en el que se informan los valores de PBG urinario y la actividad de PBG-D eritrocitaria de sus integrantes. Estos datos permitieron la clasificación de los mismos en portadores silenciosos, manifiestos asintomáticos o con sintomatología clínica, y no portadores del síndrome.

En el caso del individuo IV.5, los síntomas clínicos y los

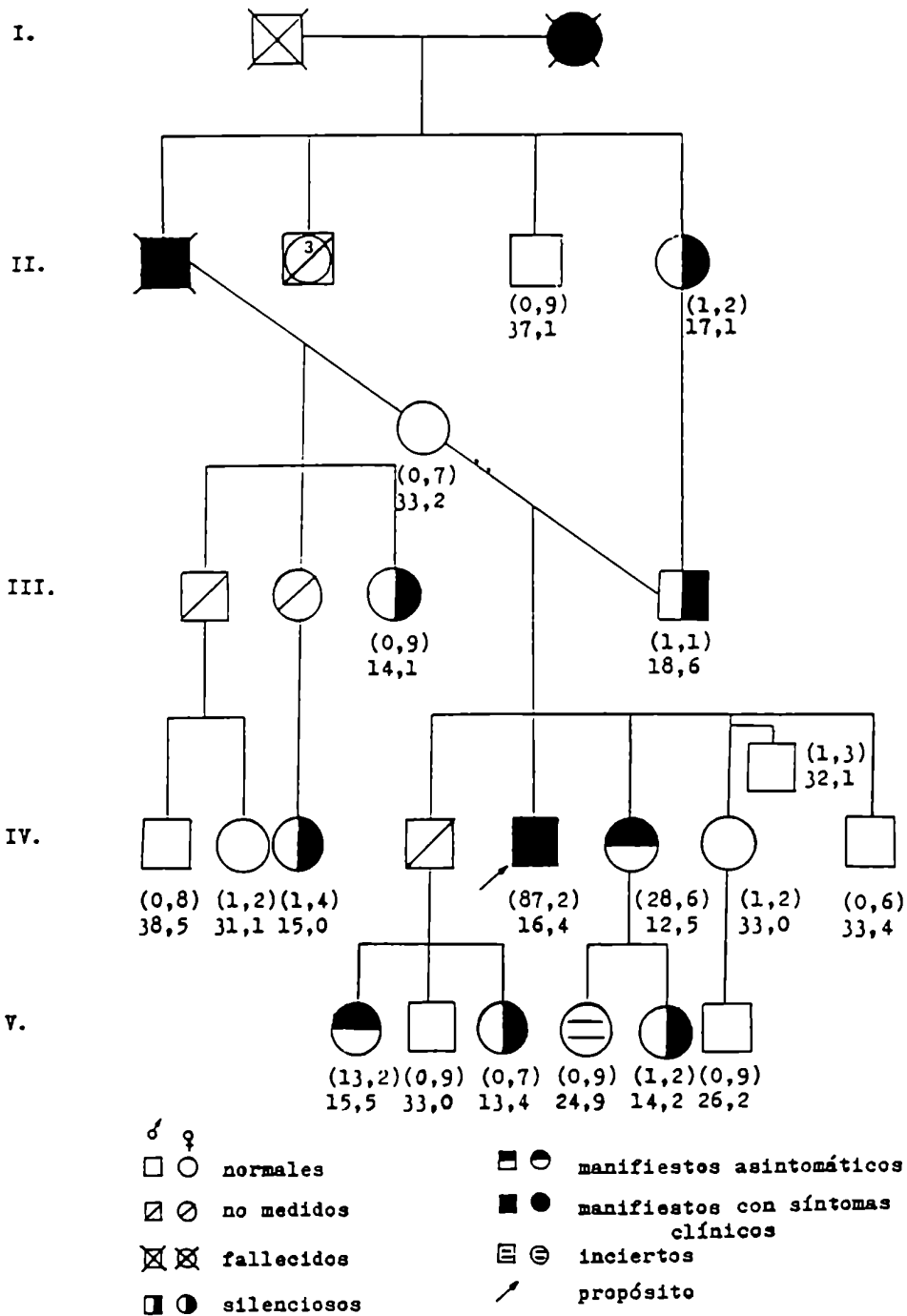


FIG. 55: ESTUDIO FAMILIAR.

Las determinaciones de P3G urinario y actividad de P3G-D en sangre se realizaron según se especifica en Métodos. Los valores de P3G son expresados en $\mu\text{g}/24 \text{ hs}$ y se indican entre paréntesis, los de P3G-D eritrocitaria en U/al G.R. y se informan debajo de los de P3G.

estudios bioquímicos coincidieron con los de una crisis aguda de PAI y motivaron posteriormente el estudio familiar. Así, el individuo IV.6 se clasificó, en virtud del análisis bioquímico, como portador manifiesto asintomático en el período del estudio. El individuo IV.3 se clasificó como portador latente por su valor disminuido de la actividad de PBG-D eritrocitaria y su nivel normal de PBG urinario, el IV.4 como incierto por su valor de PBG-D eritrocitaria (dentro del rango de solapamiento) y el V.6 como no portador debido a la actividad normal de sus progenitores.

De lo expuesto hasta aquí, puede concluirse que en los pacientes en crisis, el síndrome se dignostica mediante el análisis de los síntomas clínicos y datos bioquímicos, dados estos últimos por la acumulación de PBG, en mayor cantidad que la de ALA, y porfirinas en excretas y fluidos biológicos.

El estudio familiar de pacientes con PAI (propósitos) permitió habitualmente descubrir los portadores latentes y manifiestos asintomáticos. La medición de PBG-D eritrocitaria resulta un buen método diagnóstico de esta patología, sin embargo, para supuestos casos latentes existe cierta incertidumbre para su clasificación (incierto) como ya se ha señalado. También ésta puede resultar errónea, cuando la disminución de la actividad no existe en eritrocitos y sí en hígado. En nuestros estudios familiares no se ha detectado hasta el presente este tipo de PAI.

Debido a la existencia de isoenzimas tejido-específicas (eritroide y no-eritroide) la medición de PBG-D hepática constituiría el método diagnóstico más concluyente, pero resulta dificultosa y riesgosa la obtención del material (punciones, biopsias).

III.4.1.3 Dosaje de proteína inmunorreactiva

La posibilidad de detectar portadores latentes no

identificables por los métodos ya indicados y/o variantes del síndrome porfírico, llevó a encarar la cuantificación de proteína inmunorreactiva, PBG-D, en controles y portadores del gen de la PAI. Para estos estudios se empleó el anticuerpo anti-PBG-D eritrocitaria mono específico obtenido, cuyo título (1:85) se estimó mediante ensayos de inmunotitulación según se describe en la sección III.2.2.1. Cabe aclarar que cuando se utilizó como antígeno, lisados de globulos rojos provenientes de pacientes con PAI, se obtuvo un idéntico título del anticuerpo; lo que demuestra que la disminución de la actividad enzimática se corresponde con la reducción de proteína que reacciona inmunológicamente.

El electroinmunoensayo realizado con proteína eritrocitaria purificada y los resultados obtenidos en dichas corridas (sección III.2.2.3) posibilitaron la utilización de este método para el dosaje de PBG-D en lisados de eritrocitos de individuos controles y porfíricos.

En las Fig.66 puede apreciarse que muestras de eritrocitos lisados de portadores silenciosos (orificio 6), manifiestos (orificio 2) e individuos controles (orificios 4, 5 y 7 a 11) exhibieron una idéntica relación de la actividad enzimática versus la cantidad de proteína inmunorreactiva, por lo tanto los individuos porfíricos investigados pertenecen dentro de la clasificación al tipo CRIM-negativo (419).

Dicha relación, en los pacientes examinados, mostró un valor de $1,3 \pm 0,2$ mU/ng, sugiriendo que la disminución de la actividad enzimática de PBG-D observada podría deberse a la ausencia de transcripción del alelo mutado o bien a la producción de un mRNA que se procesara anormalmente y/o de una enzima que se degradara muy rápido, no pudiendo detectarse inmunológicamente. Llewellyn y col. (427), usando el ensayo de protección contra la acción de RNAsa para analizar la expresión del alelo mutado en un sujeto CRIM-negativo, demostraron la transcripción del mismo con una delección de 50 nucleótidos.

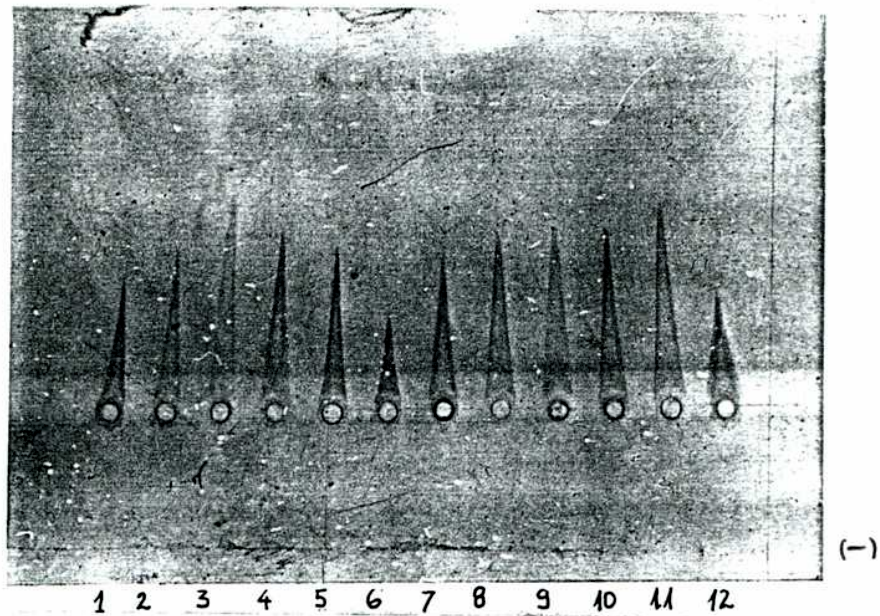


FIG. 66: ELECTROINMUNGENSAYO DE LISADOS DE ERITROCITOS DE PACIENTES CON PAI Y CONTROLES.

La preparación de los lisados y las condiciones de la corrida y del revelado se indican en Métodos. Orificios 1, 2 y 3 contenían 60, 80 y 120 mU de PBG-D purificada respectivamente; orificios 4, 5, 7, 8, 9, 10 y 11 contenían 10 µl de lisados de eritrocitos de individuos controles (87, 82, 80, 76, 90, 90 y 98 mU de PBG-D respectivamente) orificios 6 y 12 contenían 10 µl de lisados de eritrocitos de individuos portadores de PAI (43 y 56 mU de PBG-D respectivamente).

Por otra parte, aunque resulta poco probable, no se descarta la posibilidad de que el anticuerpo generado no reconozca a una proteína cuya mutación haya afectado al sitio antigénico.

La metodología aquí presentada permite otro criterio de evaluación y por lo tanto colabora con el diagnóstico de la PAI mediante el dosaje de proteína inmunorreactiva, que en los portadores estudiados del síndrome exhibió valores en el rango de 7,2 a 23 ng/ μ l GR y en controles 20,7 a 43,8 ng/ μ l GR. Debe hacerse la salvedad que corresponde medir siempre la actividad catalítica de PBG-D en las muestras, ya que podría darse el caso de la presencia de proteína inmunorreactiva no catalítica que condujera, por el electroinmunoensayo, a un falso diagnóstico negativo. En los ensayos realizados hasta el momento, no se han detectado pacientes que presenten el tipo inmunológico clasificado como CRIM-positivo.

III.4.1.4 Perfiles de isoelectroenfoque de PBG-D eritrocitaria

La existencia de formas múltiples de la enzima generadas por interacción con su sustrato, llevó a realizar estudios comparativos entre individuos normales y porfíricos, utilizando la caracterización por puntos isoelectrónicos. Para ello se aplicó la técnica de isoelectroenfoque a muestras de lisados de eritrocitos. En las Figs.67 y 68 se aprecian dos corridas típicas, de cuyo análisis se han obtenido los siguientes resultados:

a) En individuos controles, la aparición de cuatro a cinco bandas con actividad enzimática y pI de 6,3; 6,0; 5,7; 5,5 y 5,3; y una distribución de la actividad enzimática que hizo corresponder la mayor proporción de la misma a las bandas más catódicas (carriles 3 y 5 en Fig.67 y carril 3 en Fig.68).

b) En portadores silenciosos, una igual posición y distribución de la actividad de las bandas, con respecto a las

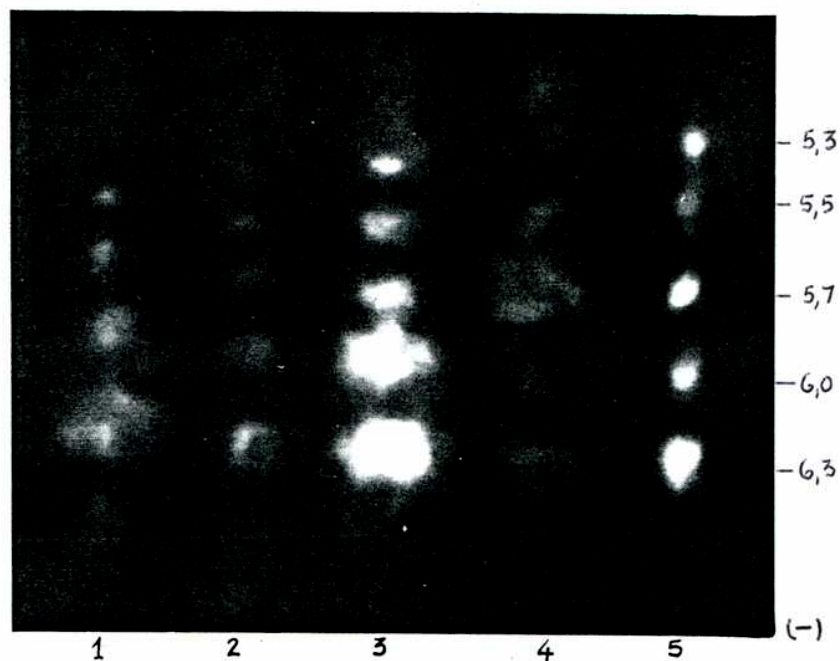


FIG. 67: PERFILES DE ISOELECTROENFOQUE DE PBG-D ERITROCITARIA HUMANA.

Todas las muestras sembradas consistieron en lisados de eritrocitos lavados obtenidos por congelamientos y descongelamientos. Carril 1 y 2: portadores de PAI silenciosos, carril 3 (siembra en banda) y carril 5 (siembra en punto): controles, carril 4: portador manifiesto asintomático. Las corridas se realizaron en geles planos de agarosa con un rango de pH 5-8. Las condiciones de corrida, el revelado de la actividad enzimática y la determinación de los pI se realizaron según se indica en Métodos.

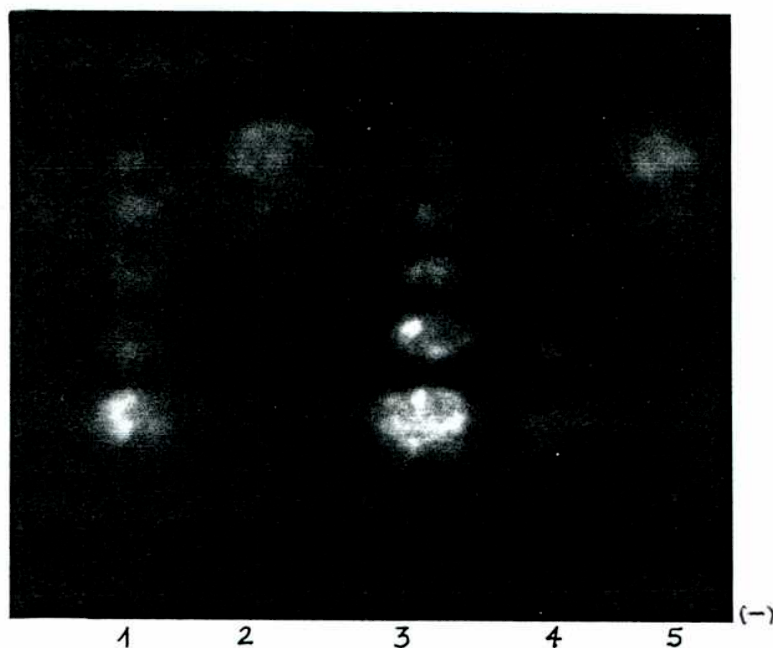


FIG.68: PERFILES DE ISOELECTROENFOQUE DE PBG-D ERITROCITARIA HUMANA.

La preparación de las muestras sembradas y las condiciones de la corrida son las mismas que las indicadas en la Fig.67. Carril 1 y 4: portadores de PAI silenciosos, carril 2: portados manifiesto, con nivel urinario de PBG de 60 µg/d, carril 3: control, carril 5: portador manifiesto en crisis, con nivel urinario de PBG de 95 µg/d.

de individuos controles, excepto una reducción ($\approx 50\%$) de la misma en todas ellas (carriles 1 y 2 en Fig.67 y carriles 1 y 4 en Fig.68).

c) En portadores manifiestos en estadios de crisis, un aumento en la proporción de la actividad correspondiente a las bandas más ácidas (carril 5 en Fig.68).

d) En portadores manifiestos (no crisis), una distribución de la actividad en las distintas bandas dependiente de la concentración plasmática de PBG y por ende de su nivel urinario. Así, en individuos con concentraciones elevadas (nivel urinario de 60 mg diarios) la actividad enzimática se observa casi totalmente desplazada hacia las bandas más ácidas (carril 2 en Fig.68).

e) En todos los portadores manifiestos de una familia sin sintomatología clínica, un perfil peculiar exhibiendo la banda de pI 5,7 significativamente aumentada (carril 4 en Fig.67).

Los resultados señalados en c) se explican en virtud de la concentración mayor de PBG presente durante los estadios de crisis, que determinan la presencia de una elevada proporción de los isómeros de carga con mayor número de moléculas de sustrato y que normalmente se generan por la unión de 1, 2, 3 ó 4 moléculas de PBG a la enzima. Dichos perfiles han podido reproducirse preincubando la enzima de portadores silenciosos con el sustrato (80 μM) a 37°C durante 30 min y efectuando posteriormente la corrida.

Del análisis de los resultados expuestos se infiere que la aplicación de esta técnica constituye un apoyo al diagnóstico y al seguimiento de portadores latentes y manifiestos de esta patología.

III.4.2 HEMATINA: SEGUIMIENTO DE LA TERAPIA

Desde hace varios años se lleva a cabo en múltiples instituciones sanitarias del país, con la colaboración de

nuestro grupo de trabajo, la administración de hematina como la forma más efectiva de terapia para ataques agudos de porfiria. El establecimiento de estas crisis porfíricas se hace a través de una serie sucesiva de estadios con signos y síntomas clínicos que han sido descriptos por Irigoyen y Tomio (248). Estos estadios se resumen en la Tabla XXII.

TABLA XXII: SINTOMAS CLINICOS DEL ATAQUE AGUDO.

ESTADIO	
MODERADO	SEVERO
1 . Alteración en el carácter . Dolor muscular (abdominal) . Taquicardia . Hipertensión	4 . Reflejos profundos disminuídos . Voz susurrante
2 . Vómitos . Constipación . Confusión mental	5 . Parálisis muscular general . Atrofia del nervio óptico
3 . Debilidad muscular . Contracturas . Convulsiones . Alucinaciones	6 . Parálisis respiratoria . Coma . Muerte

La aplicación de hematina, según se indica en Métodos, por profesionales médicos a un número importante de pacientes (más de 130 infusiones, cerca de 50 crisis de PAI) ha permitido

realizar un análisis estadístico de los resultados y comprobar su eficacia terapéutica. Para ello se ha evaluado la evolución clínica y bioquímica, esta última mediante el dosaje de la hematina sérica a distintos tiempos de su administración y la cuantificación de los metabolitos hémicos, ALA, PBG y porfirinas urinarias.

En la Fig.69 se presentan los parámetros bioquímicos medidos antes, durante y después de la terapia con hemo, en un caso típico: paciente en ataque agudo (estadio 3 a 4, moderado a severo) con niveles urinarios de: PBG, 145 mg/d; ALA, 63 mg/d y porfirinas, 1.850 μ g/d. Este paciente tratado primariamente con exceso de glucosa mostró poca reversión de los niveles de los precursores (días 1 a 7) y deterioro de sus condiciones clínicas.

El tratamiento con hematina consistió en infusiones de 180, 120, 150, y 100 mg por día, administradas por vía intravenosa cada 24 hs durante 4 días consecutivos. Como se aprecia en la Fig.69, los niveles de ALA y PBG disminuyeron en un 50 y 25% respectivamente después de las 36 hs, siendo luego esta disminución más significativa. Así, el ALA alcanzó un valor casi normal a los 3 días después de iniciada la terapia y el PBG mostró uno de los valores más bajos (\approx 20% del inicial). Después de finalizado el tratamiento, estos valores se incrementaron, retornando a sus niveles estacionarios y mostrando el típico rebote observado también por otros investigadores (230). La recuperación clínica comenzó después del primer día y se acentuó notablemente en el transcurso de la terapia. El seguimiento de los metabolitos ALA y PBG realizado en los meses subsiguientes (Fig.69), mostró valores basales superiores a los normales, rasgo característico observado en la generalidad de portadores de PAI, una vez que la enfermedad ha hecho eclosión. Sin embargo no se registraron síntomas clínicos característicos de crisis, salvo en una oportunidad (7-15 septiembre) asociados a un síndrome febril gripal, concurrente

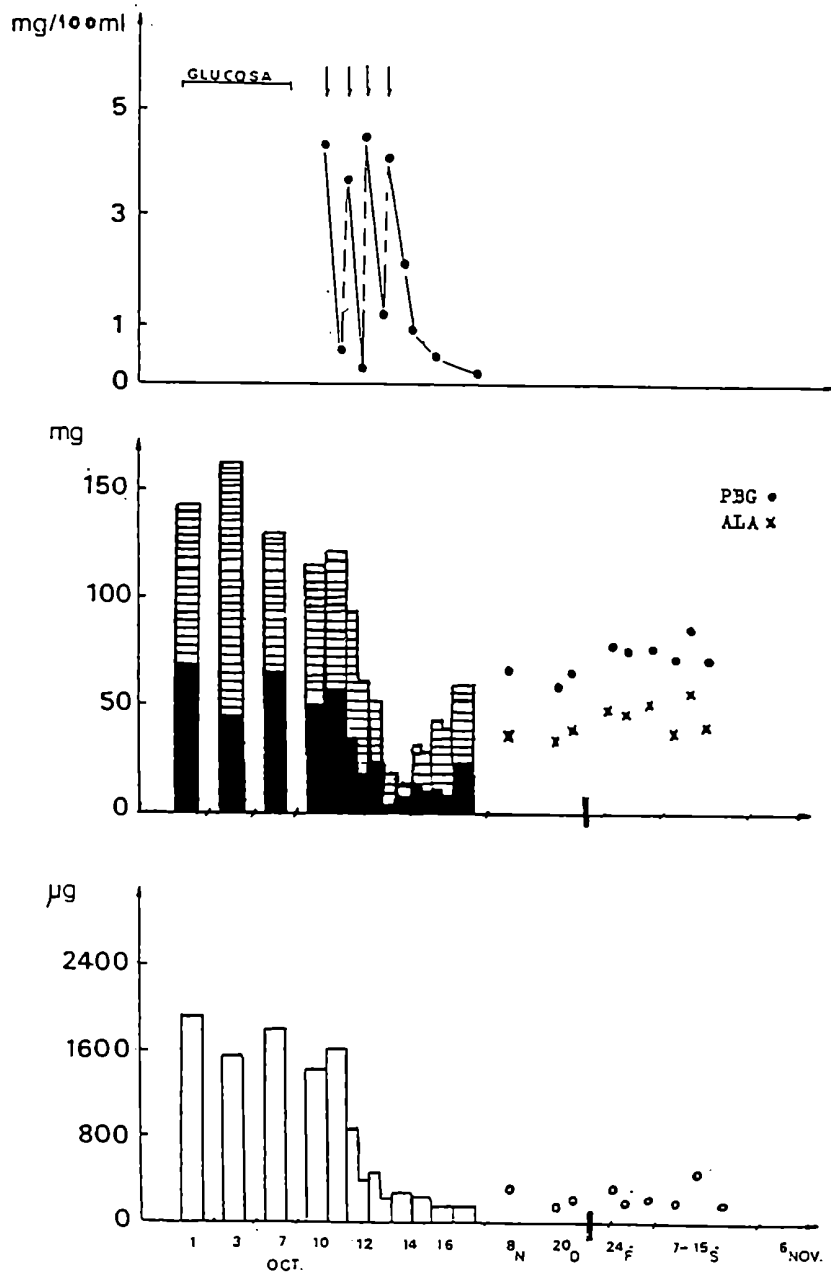


FIG. 19: SEGUIMIENTO DE LA TERAPIA CON HEMATINA.

El dosage de hematina en plasma se realizó según se indica en Métodos a los tiempos señalados. Las dosis de hematina (1) se administraron durante cuatro días, cada 24 hs. fueron de 180, 120, 150 y 100 mg totales sucesivamente. La determinación primaria de ALA (■); PBG (●) y confirmando (□) se realizaron según se especifica en Métodos cada 10 a 24 hs durante el tratamiento y a los tiempos indicados una vez que éste finalizó.

con elevación leve del nivel de los metabolitos.

En la Tabla XXIII se presenta un resumen de los casos de PAI estudiados que han recibido tratamiento con hematina. De un total de 48 crisis agudas, 22 de ellas correspondientes a los estadios 3 a 5 (moderados y severos) tratadas con 78 infusiones, mostraron recuperación en un 90%, con una disminución de los niveles de los metabolitos en todas ellas y una marcada mejoría sintomática. Mientras que aquellas en que la terapia se inició ya en estadio 6 (8 casos), presentando síntomas muy severos como parálisis generalizada, asistencia respiratoria y/o coma, si bien mostraron disminución de los parámetros hémicos, no pudieron revertir el deterioro instalado. Se hace notar que en estos casos raramente se pudo llegar a completar la serie de cuatro infusiones. La excepción, la constituyó una paciente (Tabla XXIII, estadio 6, 1*) que logró recuperarse después de 4 meses con repetidas series de infusiones de la droga y 12 meses de terapia física.

Actualmente, comprobada la bondad del tratamiento con hematina, éste se inicia ni bien se observan síntomas de los estadios iniciales (1 ó 2) con mejorías notables aún con dosis únicas (1-2 mg/kg peso) abortando el establecimiento de los estadios severos (Tabla XXIII).

TABLA XXIII: TERAPIA CON HEMATINA DE PACIENTES CON PAI

ESTADIO	CRISIS (Infusiones)		RECUPERACION
1 - 2	18	(22)	100 %
3 - 5	22	(78)	90 %
6	8-1*	(36)	12 %

* Paciente recuperada

De todos los datos expuestos se infiere que la administración de hematina en dosis más bajas que las informadas en la literatura (230, 452) desde 1 a 2 mg por kg de peso corporal, resulta suficiente para revertir las crisis aún severas (hasta estadio 5), tanto bioquímica como clínicamente en pacientes con PAI. El número de dosis, la cantidad de droga suministrada en cada uno de ellas y la frecuencia de su aplicación depende de la severidad inicial del cuadro clínico y bioquímico.

Las metodologías aplicadas para el seguimiento de esta terapéutica, tales como el dosaje de la droga en suero y la cuantificación de metabolitos hémicos, fundamentalmente ALA y PBG en orina; son sensibles y eficaces para evaluar la evolución desde el punto de vista bioquímico del paciente y concertar una modalidad terapéutica certera.

Conclusiones

A través del proyecto de investigación llevado a cabo y cuyos resultados se exponen en los capítulos precedentes se han logrado alcanzar los objetivos propuestos:

* Se logró purificar a homogeneidad la PBG-D de hígado de rata, mediante una secuencia de pasos cuyo desarrollo sirvió de modelo para la obtención de la enzima hepática humana.

Los ensayos de caracterización demostraron que es una proteína globular tipo prolato, de 42 kDa de masa molecular, con bajo contenido de aminoácidos azufrados, con cinética michaeliana y marcadamente estable frente a la temperatura.

La enzima pura se presenta como una unidad proteica con pI 4,9, mientras que fracciones parcialmente purificadas muestran polimorfismo de carga que se atribuye a la existencia de isómeros enzima-sustrato.

Las actividades específicas de la enzima hepática de rata en período fetal, neonatal y prepuberal son mayores que en adulto, revelando una modulación de la actividad tisular como reflejo de la diferente funcionalidad temporal del órgano.

* La gran contaminación eritrocitaria del tejido hepático humano accesible, no permitió el abordaje clásico de la homogeneización directa del material para la obtención de la PBG-D, enzima clave en la PAI. Se implementó entonces, un método sencillo de aislamiento de las enzimas citosólicas de tejido hepático humano, eliminando los glóbulos rojos y por ende, la isoenzima eritrocitaria.

Se llevó a cabo la purificación a homogeneidad y la caracterización de la PBG-D hepática humana.

Los resultados descriptos muestran su existencia sólo en el citosol como una proteína globular termoestable de estructura monomérica de 45.000 Da, relativamente simétrica.

Presenta una cinética clásica (hiperbólica), sin "lag" ni inhibición por sustrato lo que sugiere un mecanismo de desplazamiento secuencial con liberación de amonio en cada una de las etapas. Cataliza la reacción de polimerización en forma estequiométrica y en condiciones determinadas muestra valores compatibles con la formación de complejos intermedios enzima-sustrato.

Este proceso, mediante etapas discretas con formación de intermediarios, se vio ratificado por la demostración de la existencia de formas moleculares múltiples en la enzima hepática humana, similarmente a lo informado para la enzima eritrocitaria humana y la de eucariotes inferiores.

* El análisis de las características fisico-químicas de la enzima en tejido hepático de mamíferos tan diferentes como rata y hombre, muestra sin embargo, una similitud bastante marcada, lo cual permite sugerir una conservación estructural a nivel de su evolución filogenética.

* Estudios sobre las características tejido-específicas de las PBG-D humanas, permitieron comparar el comportamiento de la enzima hepática y la eritrocitaria desde el punto de vista fisico-químico, cinético, estructural e inmunológico.

Se demostró la existencia de formas moleculares cargadas diferencialmente. El análisis de los perfiles de cromatografía de intercambio iónico y de los pI obtenidos por isoelectroenfoque, revelaron la presencia de picos o bandas de actividad en la enzima hepática humana que difieren en número y posición respecto de los de la eritrocitaria. Las formas hepáticas aparecieron siempre en menor número (1 ó 2 vs. 4 ó 5) y en conjunto mostraron perfiles de pI más acidicos que los de glóbulos rojos (5,8-5,5 vs. 6,3-5,3).

El PM de la proteína hepática, obtenida por diferentes metodologías resultó ser siempre mayor que el de la

eritrocitaria. Esta diferencia observada e informada, fue posteriormente confirmada mediante estudios de secuenciación de cDNA.

Los parámetros cinéticos característicos: K_m , $V_{m\acute{a}x}$, así como la dependencia de la actividad de ambas enzimas frente a la temperatura, fuerza iónica, efectores, etc., mostraron siempre diferencias significativas, convalidando una vez más que sus características son tejido-específicas.

* Sus comportamientos frente a efectores químicos, como reactivos tiólicicos, PPL y particularmente cationes han permitido presentar un modelo molecular de interacción ligante macromolecular-ligandos, que si bien es diferencial en términos de valores absolutos de las inhibiciones resultantes para las enzimas investigadas, presenta analogías relativas. Según este modelo, grupos sulfhidrilos aislados o vecinales, así como grupos aminos serían importantes para el proceso catalítico.

* Los experimentos de modificación química de aminoácidos básicos y ácidos llevados a cabo con la enzima hepática humana han posibilitado indagar sobre la naturaleza de los grupos funcionales que participarían en la catálisis. Sus resultados permiten postular la existencia de residuos de arginina y grupos carboxilatos comprometidos en el centro activo de la enzima.

Todos estos hallazgos, así como lo valores de pKa obtenidos y los recabados de la literatura para otras PBG-D permitieron proponer un modelo para su centro activo como el presentado en la sección III.3.4, con dos sitios: uno de entrada para orientación del sustrato y otro de unión al DPMC y polimerización catalítica. Así, se ha propuesto: que la adición del sustrato -PBG- causaría un cambio conformacional que conduciría a la exposición de grupos -SH normalmente ocluidos en la enzima nativa; que grupos aminos cargados de la enzima

interactuarían mediante pares iónicos con grupos carboxilatos del sustrato, especialmente los propionatos; la existencia probable de una unión disulfuro y grupos carboxilatos que estarían comprometidos, no sólo en la actividad catalítica de la enzima, sino también en su estabilidad y conformación dinámica.

* Los análisis inmunoquímicos, por otra parte, demostraron una identidad total entre las isoenzimas hepáticas y eritrocitaria humana mientras que se halló identidad parcial entre las enzimas hepáticas de rata y humana. Estos datos convalidan una vez más la diferenciación entre especies y la homología entre isoenzimas de un mismo organismo, ambas citosólicas.

* Desde el punto de vista aplicado se logró incorporar a los métodos diagnósticos de PAI actualmente utilizados, el dosaje de proteína inmunorreactiva y la determinación de los perfiles de pI correspondientes a la enzima eritrocitaria, que aportan otros criterios de evaluación de portadores latentes y manifiestos asintomáticos.

En el estudio poblacional de PAI, sólo se han encontrado hasta el presente portadores que exhiben una disminución de la actividad enzimática que se corresponde con la disminución de la cantidad de proteína inmunorreactiva (tipo CRIM-negativo).

* Se comprobó estadísticamente la eficiencia de la terapia con hematina, cuya utilización y seguimiento se practica en nuestro país (Laboratorio de Porfirinas, F.C.E. y N.) desde 1977, según las modalidades descritas en la sección III.4.2, así como en Estados Unidos desde 1973 y recientemente en Europa.

* Los pasos futuros a seguir en estos campos de investigación deberán estar orientados al estudio más extensivo

de portadores de PAI, para determinar si la existencia de la heterogeneidad genética constituye un factor condicionante en la diferencial evolución crítica de esta patología. En este contexto, es fundamental contar con material hepático de diferentes portadores para realizar la caracterización de la PBG-D defectiva, y su comparación con la de la enzima hepática humana normal, cuyos resultados se presentan en este trabajo; permitiendo así, la evaluación de las posibles causas que originan la variabilidad a nivel de expresión proteica.

* Las características diferenciales halladas para ambas enzimas humanas, respecto de sus parámetros moleculares y cinéticos, avalan la existencia de isoenzimas tisulares (tejido-específicas) y convalidan a la PAI como una enfermedad molecular de origen hepático.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'J. S. P.' or similar, written in a cursive style.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'P. G.' or similar, written in a cursive style.

IV. Bibliografía

- 1 - FISHER, H. y ORTH, H. (1934) en Die Chemie des Pyrrols, Vol I; (1937) Vol III y (1940) Vol II2, Akademische Verlagsgesellschaft m.b.h., Leipzig.
- 2 - IUPAC-IUB Joint Commission in Biochemical Nomenclature (JCBN) (1980) Eur. J. Biochem. 108, 1-30.
- 3 - ATOR, M.A. y ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1542-1551.
- 4 - PADMANABAN, G. VENKATESWAR, V. y RANGARAJAN, P.N. (1989) TIBS 14, 492-496.
- 5 - HOARD, J.L. (1971) Science 174, 1295-1302.
- 6 - CASTRO, C.E. (1980) Pharmac. Ther. 10, 171-189.
- 7 - BOTTOMLEY, S.S. y MULLER-EBERHARD, V. (1988) Semin. Hematol. 25, 282-302.
- 8 - GIBSON, G.H. (1970) J. Biol. Chem. 245, 3285-3288.
- 9 - KEILIN, D. y HARTREE, E.F. (1939) Proc. Roy. Soc. (London) Ser. B. 127, 167-174.
- 10 - STOPPANI, A.D.M. y BOVERIS, A.A. (1983) en Bioquímica General pp. 453-473 Ed. El Ateneo, Buenos Aires.
- 11 - DICKERSON, R.E. y TIMKOVICH, R. (1975) en The Enzymes (Boyer, P.D., ed.) Vol.2, pp. 397-547, Academic Press New York.
- 12 - FRYDMAN, B. y FRYDMAN, R.B. (1983) en Bioquímica General, pp. 265-282. Ed. El Ateneo, Buenos Aires.
- 13 - CAPALDI, R.A., MALATESTA, F. y DARLEY-USMAR, V.M. (1983) Biochim. Biophys. Acta 726, 135-148.
- 14 - POWERS, L., CHANCE, B., CHING, Y. y AMGIOLILLO, P. (1981) Biophys. J. 34, 465-498.
- 15 - GROVES, J.T. (1985) J. Chem. Educ. 62, 928-931.
- 16 - GUENGERICH, F.P. y MAC DONALD, T.L. (1984) Acc. Chem. Res. 17, 9-18.
- 17 - HALL, P.F. (1986) Steroids 48, 131-196.
- 18 - NEBERT, D.W., NELSON, D.R., ADESNICK, M., COOM, M.J., ESTABROOK, R.W., GONZALEA, F.J., GUENGERICH, F.P., GUMZALUS, I.C., JOHNSON, E.F., KEMPER, B., LEVIN, W., PHILLIPS, I.R., SATO, R. y WATERMAN, M.R. (1989) OMA 8, 1-13.
- 19 - ZEILE, K. y HELLSTRÖM, H. (1930) Z. Physiol. Chem. 192, 171-192.
- 20 - DIESSEROTH, A. y DOUNCE, A.L. (1970) Physiol. Rev. 50, 319-375.
- 21 - BADAWY, A.A.-B., MORGAN, C.J. y DAVIS, N.R. (1986) en Porphyrins and Porphyrins (Nordmann, Y.ed.) pp. 69-81 John Libbey Eurotex, London.

- 22 - LASCELLES, J. (1964) en *Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation*, W.A. Benjamin, New York.
- 23 - GRANICK, S. y MAUZERALL, D. (1958) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 75, 115-121.
- 24 - BATTERSBY, A.R. y Mc DONALD, E. (1979) *Acc. Chem. Res.* 12, 14-22.
- 25 - DIEKERT, G., JAENCHEN, R. y THAUER, R.K. (1980) *FEBS, Lett.* 119, 118-120.
- 26 - WHITE, D.C. y GRANICK (1963) *J. Bacteriol.* 85, 842-850.
- 27 - KIKUCHI, G., KUMAR, A., TALMAGE, P. y SHEMIN, D. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 1214-1221.
- 28 - GIBSON, K.D., LAVER, W.G. y NEUBERGER, A. (1958) *Biochem. J.* 70, 71-81.
- 29 - MARVER, H.S., TSCHUDY, D.P., PELROTH, M.G. y COLLINS, A. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 2803-2809.
- 30 - NAKAO, K., WADA, O., KITAMURA, T. y UONO, K. (1966) *Nature* 210, 838-839.
- 31 - TAKAKU, F., WADA, O. y NAKAO, K. (1968) *Cancer Res.* 28, 1250-1255.
- 32 - PORRA, R.J., BARNES, R., JONES, O.T.G. (1972) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 353, 1365-1368.
- 33 - BRATTSTEIN, L.B. y WILKINSON, C.F. (1975) *Biochem. J.* 150, 97-104.
- 34 - SCHOLNICK, P.L., HAMMAKER, L.E. y MARVER, H.S. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 4132-4137.
- 35 - AKHTAR, M., ABBOUD, M.M., BARNARD, G., JORDAN, P.M. y ZAMAN, I. (1976) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* 273, 117-136.
- 36 - NANDI, D. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 8872-8887.
- 37 - SCOTTO, A.W., CHANG, L.F.L. y BEATTIE, D.S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 81-90.
- 38 - HAYASHI, N. YODA, B. y KIKUCHI, G. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 83-91.
- 39 - BEATIE, D.S. y STUCHELL, R.N. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 139, 291-297.
- 40 - GROSS, S.R. y HUTTON, J.J. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 606-614.
- 41 - WHITTING, M.J. y ELLIOTT, W.H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6818-6826.
- 42 - OHASHI, A. y KIKUCHI, G. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 34-46.
- 43 - IGARASHI, J., HAYASHI, N. y KIKUCHI, G. (1976) *J. Biochem.* 80, 1091-1099.
- 44 - HAYASHI, N., YODA, B. y KIKUCHI, G. (1970) *J. Biol. Chem.* 67, 859-861.
- 45 - KAPLAN, B.H. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 235, 381-388.
- 46 - AOKI, Y., WADA, O., URATA, G., TAKAKU, F. y NAKAO, K. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 568-575.

- 47 - SCHOLNICK, P.L., HAMMAKER, L.E. y MARVER, H.S. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 4126-4131.
- 48 - WOOD, J.S. y MURTHY, V.V. (1975) *Mol. Pharmacol.* 11, 70-78.
- 49 - NAKAKUKI, M., YAMAUCHI, K., HAYASHI, N. y KIKUCHI, G. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1738 -1745.
- 50 - YAMAMOTO, M., FUJITA, H. WATANABE, N., HAYASHI, N. y KIKUCHI, G. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 245, 76-83.
- 51 - RIDDLE, R.D., YAMAMOTO, M. y ENGEL, J.D. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 792-796.
- 52 - PIROLA, B.A., MEYER, F., BORTHWITCK, I.A., SRIVASTAVA, G., MAY, B.K. y ELLIOTT, W.H. (1984) *Eur. J. Biochem.* 144, 577-579.
- 53 - WADA, O., SASSA, S., TAKAKU, F., YANO, Y., URATA, G. y NAKAO, K. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 148, 585-587
- 54 - SASSA, S. (1976) *J. Exp. Med.* 143, 305-315.
- 55 - BISHOP, D.F., KITCHEN, H. y WOOD, W.A. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 206, 380-391.
- 56 - WATANABE, N., HAYASHI, N. y KIKUCHI, G. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 377-383.
- 57 - YAMAMOTO, M., YEW, N.S., FEDERSPIEL, M. DOGSON, J.B., HAYASHI, N. y ENGEL, J.D. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3702-3706.
- 58 - BAWDEN, M.J., BORTHWICK, I.A., HEALY, H.M., MORRIS, C.P., MAY, B.K. y ELLIOTT, W.H. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 8563.
- 59 - BISHOP, D.F., HENDERSON, A.S. y ASTRIN, K.H. (1990) *Genomics* 7, 207-214.
- 60 - VARTICOVSKY, L., KUSHNER, J.P. y BURNHAM, B.F. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 3742-3747.
- 61 - SHANKER, J. y DATTA, K. (1983) *Biochem. Internat.* 7, 23-31.
- 62 - McKINNEY, C.E. y ADES, I.Z. (1989) *Int. J. Biochem.* 22, 347-357.
- 63 - SHANKER, J. y DATTA, K. (1985) *FEBS Lett.* 189, 129-132.
- 64 - MORTON, K.A., KUSHNER, J.P., BURNHAM, B.F. y HORTON, W.J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5325-5328.
- 65 - SINGH, N.K., CHHABRA, R. y DATTA, K. (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143, 439-446.
- 66 - SHEMIN, D. y RUSSELL, C.S. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953), 4873-4874.
- 67 - COLEMAN, D.L. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 5511-5517.
- 68 - BATTLE, A.M. del C., FERRAMOLA, A.M. y GRINSTEIN, M. (1967) *Biochem. J.* 104, 244-249.
- 69 - TOMIO, J.M., TUZMAN, V. y GRINSTEIN, M. (1968) *Eur. J. Biochem.* 6, 84-87.
- 70 - SHETTY, A.S. y MILLER, G.W. (1969) *Biochem. J.* 114, 331-337.

- 71 - VAN HENINGEN, S. y SCHEMIN, D. (1971) *Biochemistry* 10, 4676-4682.
- 72 - GURBA, P., SENNETT, R. y KOBES, R. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 150, 130-136.
- 73 - WILSON, E.L., BURGER, P.E. y DOWDLE, E.B. (1972) *Eur. J. Biochem.* 29, 563-571.
- 74 - MUTHUKRISHNAN, S. MALATHI, K. y PADMANABAN, G. (1979) *Biochem. J.* 129, 31-37.
- 75 - TSUKAMOTO, I. YOSHINAGA, T. y SANO, S. (1979) *Biochem. Biophys. Acta* 570, 167-178.
- 76 - ANDERSON, P.M. y DESNICK, R.J. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 6924-6930.
- 77 - GIBBS, P.N.B., CHAUDHRY, A.G. y JORDAN, P.M. (1985) *Biochem. J.* 230, 25-34.
- 78 - WU, W.H., SHEMIN, D. RICHARD, K.E. y WILLIAMS, R.C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1767-1770.
- 79 - BARNARD, G.F., ITOH, R., HOHBERGER, L.H. y SCHEMIN, D. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8665-8674.
- 80 - TSUKAMOTO, I., YOSHIMA, T. y SANO, S. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 570, 167-178.
- 81 - SEEHRA, J.S. y JORDAN, P.M. (1981) *Eur. J. Biochem.* 113, 435-446.
- 82 - SHEMIN, D. (1976) *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B.* 273, 109-115.
- 83 - NANDI, D.L. y SCHEMIN, D. (1968) *J. Biol. Chem.* 234, 1236-1242.
- 84 - TSUKAMOTO, I., YOSHINAGA, T. y SANO, S. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 570, 167-178.
- 85 - SCHEMIN, D. (1972) en *The Enzymes* (Boyer, P.D.ed.) Vol.III, pp. 323-337, Academic Press, New York.
- 86 - BEVAN, D.R., BODLAENDER, P. Y SHEMIN, D. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2030-2035.
- 87 - JAFFE, E.K., SALOME, S.D., CHEN, N.T. y De HAVEN, P.A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 5032-5036.
- 88 - HASNAIN, S.S., WARDELL, E.M., GARNER, C.D., SCHLOSSER, M. y BEYERSMANN, D. (1985) *Biochem. J.* 230, 625-633.
- 89 - JORDAN, P.M. y GIBBS, P.N.B. (1985) *Biochem. J.* 227, 1015-1020.
- 90 - JAFFE, E.K. y HANES, D. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9348-9353.
- 91 - JAFFE, E.K. y MARKHAM, G.D. (1987) *Biochemistry* 26, 4258-4264.
- 92 - DOYLE, D. y SCHMIKE, R.T. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5449-5459.
- 93 - GRANICK, J.L., SASSA, S., GRANICK, S. LEVERE, R.D. y KAPPAS, A. (1973) *Biochem. Med.* 8, 149-159.
- 94 - EBERT, P.S., HESS, P.A., PRYKHOLM, B.C. y TSCHUDY, D.P. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88, 1382-1390
- 95 - SASSA, S. GRANICK, S. BICKERS, D.R., LEVERE, R.D. y KAPPAS, A. (1973) *Enzyme* 16, 326-333.
- 96 - FRESHNEY, R.I. y PAUL, j. (1971) *J. Embryol. Exp. Morphol.* 26, 313-316.

- 97 - WEISSBERG, J.B. y VOYTEK, P.E. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 364, 304-319.
- 98 - SASSA, S. y BERNSTEIN, S.E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1181-1184.
- 99 - EIBERG, H., MOHR, J. y NIELSON, L.S. (1983) *Clin. Genet.* 23, 150-154.
- 100 - BEAUMONT, C., FOUBERT, C., GRANDCHAMP, B., WEIL, D., N'GUYEN, V.C., GROSS, M.S. y NORDMANN, Y. (1984) *Ann. Hum. Genet.* 48, 153-159.
- 101 - WHETMUR, J.G., BISHOP, D.F., CANTELINO, C. y DESNICK, R. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7703-7707.
- 102 - BISHOP, T.R., FRELIN, L.P. y BOYER, S. (1986) *Nucl. Acids Res.* 14, 10115.
- 103 - BISHOP, T.R., HODES, Z.I. FRELIN, L.P. y BOYER, S. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17, 1775.
- 104 - BOGARD, L. y GRANICK, S. (1953) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 39, 1176-1188.
- 105 - BOGARD, L. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 501-509.
- 106 - BOGARD, L. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 510-515.
- 107 - BATTLE, A.M. del C. y ROSSETTI, M.V. (1977) *Int. J. Biochem.*, 8, 251-267.
- 108 - BATTERSBY, A.R., FOOKES, C.J.R., MATCHAM, G.W.J. y Mc DONALD, E. (1980) *Nature (London)* 285, 17-21.
- 109 - JORDAN, P.M., BURTON, G., NORDLÖW, H., SCHENEIDER, M.M., PRYDE, L. y SCOTT, A.I. (1979) *J. Chem. Soc. Chem Commun.*, 204-205.
- 110 - BATTERSBY, A.R., FOOKES, C.J.R., MATCHAM, G.W.J., Mc DONALD, E. y GUSTAFSON-POTTER, K.E. (1979) *J. Chem. Soc. Commun.*, 316-319.
- 111 - JORDAN, P.M. y BERRY, A. (1980) *FEBS Lett.* 112, 86-88.
- 112 - BATTERSBY, A.R., FOOKES, C.J.R., GUSTAFSON-POTTER, K.E., Mc DONALD, E. y MATCHAM, G.W.J. (1982) *J. Chem. Perkin Trans. 1*, 2427-2444.
- 113 - STEVENS, E., FRYDMAN, R.B. y FRYDMAN, B. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 158, 496-498.
- 114 - STEVENS, E., FRYDMAN, R.B. y FEINSTEIN, G. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 350, 358-373.
- 115 - LEVIN, E.Y. (1968) *Science* 161, 907-908.
- 116 - LEVIN, E.Y. (1968) *Biochemistry* 7, 3781-3788.
- 117 - LEVIN, E.Y. y FLYGER, V. (1971) *Science* 174, 59-60.
- 118 - ALMAN, A.F. y JORDAN, P.M. (1988) *Biochem. Soc. Trans.*, 16, 965-966.
- 119 - LEVIN, E.Y. y COLEMAN, D.L. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 4248-4253.
- 120 - SANCOVICH, H.A., BATTLE, A.M. del C. y GRINSTEIN, M. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 191, 130-143.

- 121 - JORDAN, P.M., NORDLOV, H., BURTON, G. y SCOTT, A.I. (1980) FEBS Lett. 115, 269-272.
- 122 - JORDAN, P.M. (1982) Enzyme 28, 158-167.
- 123 - HART, G.J. y BATTERSBY, A.R. (1985) Biochem. J. 232, 151-160.
- 124 - LIM, C.K., RIDEOUT, J.M. y WRIGHT, D.J. (1983) Biochem. J. 211, 435-438.
- 125 - CLEMENT, R.P., KOHASHI, M. y PIPER, W.M. (1982) Arch. Biochem. Biophys. 214, 657-667.
- 126 - TSAI, S.-F., BISHOP, D.F. y DESNICK, R.J. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1268-1273.
- 127 - HIGUCHI, M. y BOGARD, L. (1975) Ann. New York Acad. Sci. 244, 401-418.
- 128 - KOHASHI, M., CLEMENT, R.P., TSE, J. y PIPER, W.M. (1984) Biochem. j. 220, 755-765.
- 129 - SMYTHE, E. y WILLIAMS, D.C. (1988) Biochem. J. 253, 275-279.
- 130 - JORDAN, P.M., MGBEJE, B.I.A., THOMAS, S.D. y ALWAN, A.F. (1988) Biochem. J. 249, 613-616.
- 131 - TSAI, S.-F., BISHOP, D.F. y DESNICK, R.J. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7049-7053.
- 132 - ALWAN, A.F., MGBEJE, B.I.A. y JORDAN, P.M. (1989) Biochem. J. 264, 397-402.
- 133 - MAUZERALL, D. y GRANICK, S. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1141-1162.
- 134 - CONFORD, P. (1964) Biochem. J. 91, 64-73.
- 135 - SAN MARTIN DE VIALE, L.C. ARAGONES, A. y TOMIO, J.M. (1976) Acta Physiol. Latinoam. 26, 403-414.
- 136 - BOGARD, L. (1958), J. Biol. Chem. 233, 516-519.
- 137 - HOARE, D.S. y HEART, H. (1958) Nature 181, 1592-1593.
- 138 - BATTLE, A.M. del C. y GRINSTEIN, M. (1962) Biochim. Biophys. Acta 62, 197-200.
- 139 - BATTLE, A.M. del C. y GRINSTEIN, M. (1964) Biochim. Biophys. Acta 82, 13-20.
- 140 - SAN MARTIN DE VIALE, L.C. y GRINSTEIN, M. (1968) Biochim. Biophys. Acta 191, 130-143.
- 141 - TOMIO, J.M., GARCIA, R.C. y SAN MARTIN DE VIALE, L.C. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198, 353-363.
- 142 - GARCIA, R.C., SAN MARTIN DE VIALE, L.C. y TOMIO, J.M. (1973) Biochim. Biophys. Acta 309, 203-210.
- 143 - SMITH, A.G. y FRANCIS, J.E. (1979) Biochem. J. 183, 455-458.
- 144 - JACKSON, A.H., SACOVICH, H.A., FERRAMOLA, A.M., EVANS, M. GAMES, D.E., MATLIN, S.A., ELDER, G.H. y SMITH, S.G. (1976) Phil. Trans. R. Soc., London B 273, 191-206.
- 145 - JACKSON, A.H., NAGARAJA RAO, K.R., SUPPHAYEN, D.M. y SMITH, S.G. (1977) J. Chem. Soc. Chem. Commun. 696-698.

- 146 - DE VERNEUIL, H., GRANDCHAMP, B. y NORDMANN, Y. (1980) *Biochim. Biophys. Acta.* 611, 174-186.
- 147 - DE VERNEUIL, H., SASSA, S. y KAPPAS, A. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 2454-2460.
- 148 - STRAKA, J.G. y KUSHNER, J.P. (1983) *Biochemistry* 22, 4664-4672.
- 149 - KAWANISHI, S., SEKI, Y. y SANDO, S. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 4285-4292.
- 150 - ELDER, G.H., TOVEY, J.A. y SHEPPARD, D.M. (1983) *Biochem. J.* 215, 45-55.
- 151 - ROMEO, P.H., DUBART, A., GRANDCHAMP, B., DE VERNEUIL, H., ROSA, J., NORDMANN, Y. y GOOSSENS, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 3346-3350.
- 152 - ROMEO, P.H., RAICH, N., DUBART, A., BEAUPAIN, D., PRYOR, M., KUSHNER, J., COHEN-SOLAL, M. y GOOSSENS, M. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9825-9831.
- 153 - ROMANA, M., LE BOULCH, P. y ROMEO, P.H. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 7211.
- 154 - ROMEO, P.H., RAICH, N., DUBART, A., BEAUPAIN, D., MATTEI, M.G. y GOOSSENS, M. (1986) en *Porphyrins and Porphyrins* (Nordmann, Y. ed.) pp. 25-34 John Libbey Eurotext Ltd., Paris.
- 155 - DUBART, A., MATTEI, M.G., RAICH, N., BEAUPAIN, D., ROMEO, P.H., MATTEI, J.F. y GOOSSENS, M. (1986) *Hum. Genet.* 73, 277-279.
- 156 - SANDO, S. y GRANICK, S. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1173-1180.
- 157 - YOSHINAGA, T. y SANDO, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4722-4726.
- 158 - BATTLE, A.M. del C., BENSON, A. y RIMINGTON, C. (1965) *Biochem. J.* 97, 731-740.
- 159 - BOGARD, M., CAMADRO, J.M., NORDMANN, Y. y LABBI, P. (1989) *Eur. J. Biochem.* 181, 417-421.
- 160 - ELDER, G.H. y EVANS, O. (1978) *Biochem. J.* 172, 345-347.
- 161 - GRANDCHAMP, B., PHUNG, M. y NORDMANN, Y. (1978) *Biochem. J.* 176, 97-102.
- 162 - PORRA, R.J. y FALK, J.E. (1964) *Biochem. J.* 90, 69-75.
- 163 - EHTESHAMUDDIN, A.F.M. (1968) *Biochem. J.* 107, 446-447.
- 164 - POULSON, R. y POGLASE, W.J. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 6367-6371.
- 165 - CAMADRO, J.M., CHAMBON, H., JOLLES, J. y LABBE, P. (1986) *Eur. J. Biochem.* 156, 579-587.
- 166 - ZAMAN, I. y AKHTAR, M. (1976) *Eur. J. Biochem.* 61, 215-223.
- 167 - YOSHINAGA, T. y SANDO, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4727-4731.
- 168 - TOMIO, J.M. y GRINSTEIN, M. (1968) *Eur. J. Biochem.* 6, 80-83.
- 169 - KENNEDY, G.Y., JACKSON, A.H., KENNER, G.W. y SUCKLING, C.J. (1970) *FEBS Lett.* 6, 9-12.

- 170 - CALVEIRO, J.A.S., KENNER, G.W. y SMITH, K.M. (1974) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 1188-1194.
- 171 - GAMES, D.E., JACKSON, A.H., JACKSON, J.R., BELCHER, R.V. y SMITH, S.G. (1976) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 187-188.
- 172 - ELDER, G.H., EVANS, J.D., JACKSON, J.R. y JACKSON, A.H. (1978) *Biochem. J.* 169, 215-223.
- 173 - GRANDCHAMP, B., WEIL, D., NORDMANN, Y., VAN CONG, N., DE VERNEUIL, H., FOUBERT, C., y GROSS, M.S. (1983) *Hum. Genet.* 64, 180-183.
- 174 - POULSON, R. y PULGESE, W.J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 1269-1274.
- 175 - POULSON, R. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 3730-3733.
- 176 - VILJOEN, D.J., CAYAMIS, E., BECKER, D.M., KRAMER, S., DAWSON, D. y BERSTEIN, R. (1979) *Amer. J. Hematol.* 6 185-190.
- 177 - DEYBACH, J.C., DE VERNEUIL, H. y NORDMANN, Y. (1981) *Human. Genet.* 58, 425-428.
- 178 - VILJOEN, D.J., CUMMINS, R., ALEXOPOULUS, J. y KRAMER, S. (1983) *Eur. J. Clin. Invest.* 13, 283-287.
- 179 - JACKSON, A.H., GAMES, D.E., COUCH, P., JACKSON, J.R., BELCHER, R.B. y SMITH, S.G. (1974) *Enzyme* 17, 81-87.
- 180 - SMITH, S.G., JACKSON, A.H. y JACKSON, J.R. (1976) *Ann. Clin. Res.* 81, Suppl. 17, 53-55.
- 181 - JONES, C., JORDAN, P.M. y AKHTAR, M. (1984) *J. Chem. Perkin Trans. I* 11, 2625-2629.
- 182 - CAMADRO, J.M., URBAN-GRIMAL, D. y LABBE, P. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 724-730.
- 183 - JACKSON, A.H., ELDER, G.H. y SMITH, S.G. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 877-882.
- 184 - JACOBS, N.J. y JACOBS, J.M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449, 1-9.
- 185 - JACOBS, N.J. y JACOBS, J.M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 544, 540-546.
- 186 - KLEMM, D.J. y BARTON, L.L. (1985) *J. Bacteriol.* 164, 316-320.
- 187 - POULSON, R. y PAUGLASE, W.J. (1974) *FEBS Lett.* 40, 258-260.
- 188 - KOLAROV, J. NELSON, B.D. y KUZELA, S. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 116, 383-387.
- 189 - DEYBACH, J.C., DASILVA, V. GRANDCHAMP, B. y NORDMANN, Y. (1985) *Eur. J. Biochem.* 149, 431-435.
- 190 - CAMADRO, J.M., ABRAHAM, N.G. Y LEVERE, R.D. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 242, 206-212.
- 191 - SIEPKER, L.J., FORD, M., DE KOCK, R. y KRAMER, S. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* 913, 349-358.
- 192 - DAILEY, H.A. y KARR, S.W. (1987) *Biochemistry* 26, 2697-2701.
- 193 - KLEMM, D.J. y BARTON, L.L. (1987) *J. Bacteriol.* 169, 5209-5215.

- 194 - TOKUNAGA, R. y SANO, S. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 264, 263-271.
- 195 - KASSNER, R.J. y WALCHAK, H. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 304, 294-303.
- 196 - NISHIDA, G. y LABBE, R.F. (1959) *Biochim. Biophys. Acta* 31, 519-524.
- 197 - PORRA, R.J. y JONES, O.T.G. (1963) *Biochem. J.* 87, 181-185.
- 198 - PORRA, R.J. y LASCELLES, J. (1968) *Biochem. J.* 108, 343-348.
- 199 - LABBE, P., VOLLAND, C. y CHAIX, P. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 159, 527-539.
- 200 - BOTTOMLEY, S.S. (1968) *Blood* 31, 314-322.
- 201 - JONES, M.S. y JONES, O.T.G. (1970) *Biochem. J.* 119, 453-462.
- 202 - DAILEY, H.A. (1977) *J. Bacteriol.* 132, 302-307.
- 203 - CANADRO, J.M., IBRAHIM, N.G. y LEVERE, R.D. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 5678-5682.
- 204 - DAILEY, H.A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 14714-14718.
- 205 - JONES, M.S. y JONES, O.T.G. (1969) *Biochem. J.* 113, 507-514.
- 206 - MCKAY, R., DRUYAN, R., GETZ, G.S. y RABINOWITZ, M. (1969) *Biochem. J.* 114, 455-461.
- 207 - TAKETANI, S. y TOKUNAGA, R. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 12748-12753.
- 208 - CANEPA, E.T. y LLAMBIAS, E.B.C. (1981) *Enzyme*, 26, 288-295.
- 209 - TAKETANI, S. y TOKUNAGA, R. (1982) *Eur. J. Biochem.* 127, 443-447.
- 210 - DAILEY, H.A. y FLEMING, J.E. (1983) *J. Biol. Chem.* 258, 11543-11549.
- 211 - HANSON, J.W. y DAILEY, H.A. (1984) *Biochem. J.* 222, 695-700.
- 212 - CANADRO, J.-M. y LABBE, P. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 11675-11682.
- 213 - PORRA, R.J. y JONES, O.T.G. (1963) *Biochem. J.* 87, 186-192.
- 214 - TEPHLY, T.R., GIBBS, A.R. y DE MATTEIS, F. (1979) *Biochem. J.* 180, 241-244.
- 215 - DE MATTEIS, F., GIBBS, A.H. y TEPHLY, T.R. (1980) *Biochem. J.* 188, 145-152.
- 216 - ORTIZ DE MONTELLANO, P.R., BERLAN, H.S. y KUNZE, K.L. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1490-1494.
- 217 - LABBE, R.F. y HUBBARD, N. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 41, 185-191.
- 218 - DAILEY, H.A. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 2711-2715.
- 219 - DAILEY, H.A. y FLEMING, J.E. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 7902-7905.

- 220 - DAILEY, H.A. (1985) *Biochemistry* 24, 1287-1291.
- 221 - BLOOMER, J.R., HILL, H.D., MORTON, K.O., ANDERSON-RURNHAM, L.A. y STRAKA, J.G. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 667-671.
- 222 - HARBIN, B.M. y DAILEY, H.A. (1985) *Biochemistry* 24, 366-370.
- 223 - SIMPSON, D.M. y POULSON, R. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 482, 461-469.
- 224 - KARR, S.R. y DAILEY, H.A. (1988) *Biochem. J.* 254, 799-803.
- 225 - GRANICK, S y SASSA, S. (1971) en *Metabolic Regulation* (Vogel, H.J. ed.) Vol.5 pp 77-141, Academic Press, New York.
- 226 - GRANICK, S. y URATA, G. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 821-827.
- 227 - GRANICK, S. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 1359-1375.
- 228 - GRANICK, S., SINCLAIR, P., SASSA, S. y BRIENINGER, G. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 9215-9225.
- 229 - KAPPAS, A. SASSA, S. y ANDERSON, K.E. (1983) en *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S., Goldstein, J.L. y Brown, M.S. eds.) pp. 1301-1384, Mc Graw-Hill, New York.
- 230 - DHAR, G.J., BOSSENMAIER, I., PETRYKA, I.J., CARDINAL, R. y WATSON, C.J. (1975) *Ann. Intern. Med.* 83, 20-30
- 231 - SRIVASTABA, G., BROOKER, J.D., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. (1980) *Biochem. J.* 188, 781-788.
- 232 - MAXMAN, A.D., COLLINS, A. y TSCHUDY, D.P. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 675-683.
- 233 - SINCLAIR, P.R. y GRANICK, S. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244, 509-520.
- 234 - ANDERSON, K.E., DUMONT, U., FREDDARA, M., SARDANA, K. y SASSA, S. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 676, 289-299.
- 235 - MAGUIRE, D.J., DAY, A.R. BORTHWICK, I.A., SRIVASTAVA, G., WIGLEY, P.L., MAY, B.K. y ELLIOTT, W.H. (1986). *Nucl. Acids Res.* 14, 1379-1391.
- 236 - ADES, I.Z., STEVENS, T.M. y DREW, P.D. (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 253, 297-304.
- 237 - YAMAMOTO, M., KURE, S., ENGEL, J.D. y HIGARA, K. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 15973-15979.
- 238 - SRIVASTAVA, G. BORTHWICK, I.A., MAGUIRE, D.J., ELFERINK, C.J., BANDEN, M.J., MERCER, J.F.B. y MAY, B.K. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 5202-5209.
- 239 - DE MATTEIS, F. (1978) en *Handbook Exp. Pharmacol.* (De Matteis, F. y Aldridge, W.N. eds.) Vol. 44, pp. 129-155, Springer Verlag, Berlin.
- 240 - HAYASHI, N., KUROSHIMA, Y. y KIKUCHI, G. (1972) *Arch. Biochem. Biophys* 148, 10-21.
- 241 - WHITING, M.J. (1976) *Biochem. J.* 158, 391-400.

- 242 - YAMAMOTO, N., HAYASHI, N. y KIKUCHI, G. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun* 115, 225-231.
- 243 - MAY, B.K., BORTHWICK, I.A., SRIVASTAVA, G., PIROLA, B.A. y ELLIOTT, W.H. (1986) *Curr. Top. Cell. Reg.* 28, 233-262.
- 244 - WOLFSON, S.J., BARTZAK, A. y BLOOMER, J.R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3543-3546.
- 245 - PIROLA, B.A., SRIVASTAVA, G., BORTHWICK, I.A., BROOKER, J.D., MAY, B.K. y ELLIOT, W.H. (1984) *FEBS Lett.* 166, 298-300.
- 246 - MULLER-EBERHARD, U. y VINCENT, S.H. (1985) *Biochem. Pharmacol.* 34, 719-725.
- 247 - BADAWY, A.A.-B., MORGAN, C.J. y DAVIS, N.R. (1987) *Biochem. J.* 248, 293-295.
- 248 - IRIGOYEN, E.H., TOMIO, J.M. (1981) *Pren. Méd. Argent.* 68, 131-134.
- 249 - FRYDMAN, R.B., TOMARO, M.L., WANSCHELBAUM, A., ANDERSON, E., AURUCH, J. y FRYDMAN, B. (1973) *Biochemistry* 12, 5253-5262.
- 250 - TOMARO, M.L., FRYDMAN, R.B. y FRYDMAN, B. (1973) *Biochemistry* 12, 5263-5268.
- 251 - FRYDMAN, R.B., TOMARO, M.L., FRYDMAN, B. y WANSCHELBAUM, A. (1975) *FEBS Lett.* 51, 206-209.
- 252 - WOODS, J.S. y DICKSON, R.L. (1974) *Biochem. Pharmacol.* 21, 1735-1744.
- 253 - FRESHNEY, R.I., y PAUL, J. (1971) *J. Embryol. Exp. Morphol.* 26, 313-322.
- 254 - BERU, N. y GOLDWASSER, E. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 9251-9257.
- 255 - FRYDMAN, R.B., TOMARO, M.L., SBURLATI, A. y GUTHISKY, A. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* 870, 520-529.
- 256 - SASSA, S., GRANICK, J.L., EISEN, H. y OSTERTAG, W. (1978) en *In vitro Aspects of Erythropoiesis* (Murphy, M.H. Jr., ed.) pp. 135-142, Springer-Verlag, New York.
- 257 - SASSA, S y URABE, A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76, 5231-5235.
- 258 - SASSA, S. (1980) en *In vivo and in vitro Erythropoiesis: The Friend System* (Rossi, G.B.ed.) pp. 219-228. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 259 - GRANICK, J.L. y SASSA, S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5402-5406.
- 260 - BEAUMONT, C., DEYBACH, J.C., GRANDCHAMP, B., DA SILVA, V., de VERNEUIL, H. y NORDMANN, Y. (1984) *Exp. Cell. Res.* 154, 474-484.
- 261 - PONKA, P. y SCHULMAN, H.M. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 14717-14721.
- 262 - PONKA, P., SCHULMAN, H.M. y MARTINEZ-MEDELLIN, J. (1988) *Biochem. J.* 251, 105-109.
- 263 - GARDNER, L.C. y COX, T.M. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 6676-6682.
- 264 - TAKAKU, F., YANO, Y., AOKI, Y., NAKAO, K. y WADA, O. (1972) *J. Exp. Med.* 107, 217-228.

- 265 - TENHUNEN, R., MARVER, H.S. y SCHMID, R. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61, 748-755.
- 266 - TENHUNEN, R., MARVER, H.S. y SCHMID, R. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 6388-6394.
- 267 - BISSELL, D.M. (1975) *Gastroenterol.* 69, 519-538.
- 268 - NOGUCHI, M., YOSHIDA, T. y KIKUCHI, G. (1979) *J. Biochem. (Tokyo)* 86, 833-848.
- 269 - BONNETT, R. y McDONAGH, A.F. (1973) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 881-888.
- 270 - ABRAHAM, N.G., LIN, J.H.-C., SCHWARTZMAN, M.L., LEVERE, R.D. y SHIBAHARA, S. (1988) *Int. J. Biochem.* 20, 543-558.
- 271 - MAINES, M.D., ABRAHAM, N.G. y KAPPAS, A. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5900-5903.
- 272 - YOSHIDA, T. y KIKUCHI, G. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 4487-4491.
- 273 - YOSHIDA, T. y KIKUCHI, G. (1977) *J. Biochem. (Tokyo)* 81, 265-268.
- 274 - YOSHIGA, T., SASSA, S. y KAPPAS, A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7794-7782.
- 275 - TRAKSHEL, G.M., KUTTY, R.K. y MAINES, M.D. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 11131-11137.
- 276 - SHIBAHARA, S., MULLER, R., TAGUCHI, H. y YOSHIDA, T. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7865-7869.
- 277 - YOSHIDA, T., BIRO, P., COHEN, T., MULLER, R.M. y SHIBAHARA, S. (1988) *Eur. J. Biochem.* 171, 457-461.
- 278 - YOSHIDA, T. y SATO, M. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1086-1092.
- 279 - MAINES, M.A. (1988) *FASEB J.* 2, 2557-2568.
- 280 - TOMARO, M.L., FRYDMAN, R.B., FRYDMAN, B., PANDY, R.K. y SMITH, K.M. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 791, 342-349.
- 281 - KIKUCHI, G. y YOSHIDA, T. (1983) *Mol. Cell. Biochem.* 53/54, 163-183.
- 282 - SHACTER, B.A. (1988) *Semin. Hematol.* 25, 349-369.
- 283 - ITANO, H.A. e HIROTA, T. (1985) *Biochem. J.* 226, 767-771.
- 284 - KUTTY, R.K. y MAINES, M.D. (1987) *Biochem. J.* 246, 467-474.
- 285 - KUTTY, R.K. y MAINES, M.D. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 3956-3962.
- 286 - FRYDMAN, R.B., TOMARO, M.L., AMRUCH, J., SAMBROTTA, L., VALASINAS, A. y FRYDMAN, B. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* 916, 500-511.
- 287 - FRYDMAN, R.B., TOMARO, M.L., AMRUCH, J. y FRYDMAN, B. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 758, 257-263.
- 288 - FRYDMAN, R.B., TOMARO, M.L., AMURUCH, J. y FRYDMAN, B. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121, 249-254.

- 289 - LIGHTNER, D.A. y McDONAGH, A.F. (1984) *Acc. Chem. Res.* 17, 417-424.
- 290 - ANDERSON, K.E., SIMIONATTO, C.S. DRUMMOND, G.S. y KAPPAS, A. (1986) *Clin. Pharmacol. Ther.* 39, 510-520.
- 291 - TENHUNEN, R., MARVER, H.S. y SCHMID, R. (1970) *J. Lab. Clin. Med.* 75, 410-421.
- 292 - SHIBAHARA, S., YOSHIDA, T. y KIKUCHI, G. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 607-617.
- 293 - MAINES, M.D. y KAPPAS, A. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 4293-4297.
- 294 - MAINES, M.D. y KAPPAS A. (1977) *Science* 198, 1215-1221.
- 295 - KRASNY, H.C. y HOLBROOK, D.J.Jr. (1978) *Biochem. Pharmacol.* 27, 364-366.
- 296 - SARDANA, M.D., SASSA, S. y KAPPAS, A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 4806-4811.
- 297 - DRUMMOND, G.S. (1987) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 514, 87-95.
- 298 - SARDANA, M.D. y KAPPAS, A. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 2464-2468.
- 299 - BAKEN, A.F., THALER, M.M. y SCHMID, R. (1972) *J. Clin. Invest.* 51, 530-536.
- 300 - SMITH, T.J., DRUMMOND, G.S., KUORIDES, I.A. y KAPPAS, A. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 7537-7541.
- 301 - JARISVALO, J., GIBBS, A.H. y DeMATTEIS, F. (1978) *Mol. Pharmacol.* 14, 1099-1106.
- 302 - GUZELIAN, P.S. y ELSHOURBAGY, N.A. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 196, 178-185.
- 303 - MAINES, M.D. y KAPPAS, A. (1976) *Biochem. J.* 154, 125-131.
- 304 - MATSURA, Y., FUKUDA, T., YOSHIDA, T. y KUROIWA, Y. (1984) *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* 45, 81-96.
- 305 - MULLER, R.M., TAGUCHI, H. y SHIBAHARA, S. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 6795-6802.
- 306 - SHIBAHARA, S., SATO, M., MULLER, R.M. y YOSHIDA, T. (1989) *Eur. J. Biochem.* 179, 555-563.
- 307 - SHIBAHARA, S., MULLER, R.M. y TAGUCHI, H. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12889-12892.
- 308 - SATO, M., FUKUSI, Y., ISHIZAWA, S., OKINAGA, S., MULLER, R.M. y SHIBAHARA, S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 10251-10260.
- 309 - MITANI, K., FUJITA, H. SASSA, S. y KAPPAS, A. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165, 437-441.
- 310 - FALK, J.E., DRESEL, E.J.B. y RIMINGTON, C. (1953) *Nature* 172, 292-294.
- 311 - BOGORAD, L. (1955) *Science* 121, 878-879.
- 312 - GRANICK, S. y MAUZERALL, D. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 1119-1140.
- 313 - HOARE, H. y HEATH, H. (1959) *Biochem. J.* 73, 679-690.

- 314 - DAVIES, R.C. y NEUBERGER, A. (1973) *Biochem. J.* 133, 471-492.
- 315 - JORDAN, P.M. y SCHEMIN, D. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1019-1024.
- 316 - HART, G.J., ABELL, C. y BATTERSBY, A.R. (1986) *Biochem. J.* 240, 273-276.
- 317 - EVANS, J.N.S., BURTON, G., FAGERNESS, P.E., MACKENZIE, M.E. y SCOTT, A.I. (1986) *Biochemistry* 25, 905-912.
- 318 - KOTLER, M.L., FUMAGALLI, S.A., JUKNAT, A.A. y BATTLE, A.M. del C. (1987) *Int. J. Biochem.* 19, 981-985.
- 319 - JORDAN, P.M., THOMAS, S.D. y WARREN, M.J. (1988) *Biochem. J.* 254, 427-435.
- 320 - SHIO, Y., NAGAMINE, M., KUROKI, M. y SASA, T. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 616, 300-309.
- 321 - WILLIAMS, D.C., MORGAN, G.S., McDONALD, E. y BATTERSBY, A.R. (1981) *Biochem. J.* 193, 301-310.
- 322 - BATTERSBY, A.R., FOOKES, C.J.R., MATCHAM, G.W.J., McDONALD, E. y HOLLENSTEIN, R. (1983) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 3031-3039.
- 323 - STEVENS, E. y FRYDMAN, B. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 151, 429-437.
- 324 - FRYDMAN, R.B. y FRYDMAN, B. (1970) *Arch. Biophys.* 136, 193-202.
- 325 - LLAMBIAS, E.B.C. y BATTLE, A.M. del C. (1971) *Biochem. J.* 121, 327-340.
- 326 - RUSSELL, C.S. y POLLACK, S.E. (1978) *J. Chromatog.* 166, 632-636.
- 327 - LLAMBIAS, E.B.C. y BATTLE, A.M. del C. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 227, 180-181.
- 328 - PIPER, W.N. y VAN LIER, R.B.L. (1977) *Mol. Pharmacol.* 13, 1126-1135.
- 329 - MIYAGI, K., KANESHIMA, M., KAWAKAMI, J., NAKADA, F., PETRYKA, Z.J. y WATSON, C.J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6172-6176.
- 330 - MIYAGI, K., PETRYKA, Z.J., KANESHIMA, M., KAWAKAMI, J. y PIERACH, C.A. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 769-773.
- 331 - ANDERSON, P.M. y DESNICK, R.J. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1993-1999.
- 332 - WILLIAMS, D.C. (1984) *Biochem. J.* 217, 675-683.
- 333 - BROWN, R.C., ELDER, G.H. y URQUHART, A.J. (1985) *Biochem. Soc. Trans.* 13, 1227-1228.
- 334 - FUMAGALLI, S.A., KOTLER, M.L., ROSSETTI, M.V., BATTLE, A.M. del C. (1985) *Int. J. Biochem.* 17, 485-494.
- 335 - ROOIJ, F.W.M. de, HAMER, C.M. y WILSON, J.H.P. (1987) *Clin. Chim. Acta* 162, 61-68.
- 336 - SMYTHE, E. y WILLIAMS, D.C. (1988) *Biochem. J.* 251, 237-241.
- 337 - LANNFELT, L., WETTERBERG, L., LILINS, L., THUNELL, S., JÖRNEVALE, H., PAVLU, B., WILLBURSKI, A. y BELLEFORS, P. (1989) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 49, 677-684.

- 338 - ROSSETTI, M.V., JUKMAT, A.A. y BATTLE, A.M. del C. (1989) A. Naturforsch. 44c, 578-580.
- 339 - GOMEZ-SILVA, B., TIMKO, M. y SCHIFF, J.A. (1985) Planta 165, 12-22.
- 340 - MEISLER, M.H. y CARTER, M.L.C. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2848-2852.
- 341 - MEISLER, M.H., WANNER, L., KAO, F.T. y JONES, C. (1981) Cytogenet. Cell. Genet. 31, 124-128.
- 342 - HART, G.J., MILLER, A.D., LEEPER, F.J. y BETTERSBY, A.R. (1987) J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1762-1765.
- 343 - JORDAN, P.M. y WARREN, M.J. (1987) FEBS Lett. 225, 87-92.
- 344 - JORDAN, P.M., WARREN, M.J., WILLIAMS, H.J., STOLNICH, N.J., ROESSNER, C.A., GRANT, S.K. y SCOTT, A.I. (1988) FEBS Lett. 235, 189-193.
- 345 - MILLER, A.D., HART, G.J., PACKMAN, L.C. y BATTERSBY, A.R. (1988) Biochem. J. 254, 915-918.
- 346 - WARREN, M.J. y JORDAN, P.M. (1988) Biochem. Soc. Trans. 16, 963-965.
- 347 - CARPENTER, A.I. y SCOTT, J. (1959) Biochem. J. 71, 325-333.
- 348 - FRYDMAN, R.A., STEVENS, E. y FRYDMAN, B. (1967) Anal. Asoc. Quím. Argent. 55, 287-297.
- 349 - STRAND, L.J., MEYER, U.A., FELSHER, B.F., REDEKER, A.G. y MARVER, H.S. (1972) J. Clin. Invest. 51, 2530 - 2536.
- 350 - POLLACK, S.E. y RUSSELL, C.S. (1978) FEBS Lett. 90(1), 47-50.
- 351 - RUSSELL, C.S. y ROCKWELL, P. (1980) FEBS Lett. 116, 99-202.
- 352 - SANCOVICH, H.A., FERRAMOLA, A.M., BATTLE, A.M. del C., KIVILEVICH, A. y GRINSTEIN, M. (1976) Acta. Physiol Latinoam. 26, 379-386.
- 353 - POLLACK, S.E. y RUSSELL, C.S. (1978) Fed. Proc. FASEB 37, 1339.
- 354 - HART, G.J., LEEPER, F.J. y BATTERSBY, A.R. (1984) Biochem. J. 222, 93-102.
- 355 - MILLER, A.D., PACKMAN, L.C., HART, G.J., ALEFOUNDER, P.R., ABELL, C. y BATTERSBY, A.R. (1989) Biochem. J. 262, 119-124.
- 356 - FRYDMAN, R.B. y FRYDMAN, B. (1973) Biochim. Biophys. Acta 293, 506-513.
- 357 - RUSSELL, C.S., POLLACK, S. y JAMES, J. (1984) Ann. N.Y. Acad. Sci. 435, 202-204.
- 358 - BOGARD, L. (1963) Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 676-688.
- 359 - PLUSEC, J. y BOGARD, L. (1970) Biochemistry 9, 4736-4743.
- 360 - RADNER, R. y BOGARD, L. (1972) Biochemistry 11, 904-910.
- 361 - PIPER, W.H. y VAN LIER, R.B.L. (1976) Life Sci. 19, 1225-1234.

- 362 - FRYDMAN, B., FRYDMAN, R.B., VALASINAS, A., LEVY, E.S. y FREINSTEIN, G. (1976) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 273, 137-160.
- 363 - MAUZERALL, D. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* 82, 2605-2609.
- 364 - SCOTT, A.I., HO, K.S., KAJIWARA, M. y TAKAHASHI, T. (1976) *J. Am. Chem. Soc.* 98, 1589-1590.
- 365 - FRYDMAN, R.B., LEVY, E.S., VALASINAS, A. y FRYDMAN, B. (1978) *Biochemistry* 17, 110-114.
- 366 - FRYDMAN, R.B., LEVY, E.S., VALASINAS, A. y FRYDMAN, B. (1978) *Biochemistry* 17, 115-120.
- 367 - FRANK, B., BOCK, W., BRINGMANN, G., FELS, G., GRUBENBECKER, F., MARSMAN, M., PIETSCHMANN, R., SCHAPERS, K., SPIEGEL, V., STEINKAMP, R., UFER, G. y WEGNER, CH. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 671-685.
- 368 - BATTERSBY, A.R., FOOES, C.J.R., MEEGAN, M.J., McDONALD, E. y WURZIGER, H.K.W. (1981) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2786-2798.
- 369 - SBURLATI, A., FRYDMAN, R.B., VALASINAS, A., ROSE, S., PRIESTAP, A. y FRYDMAN, B. (1983) *Biochemistry* 22, 4006-4013.
- 370 - BURTON, G.P.E., FAGERNESS, S., HOSUZAWA, S., JORDAN, P.M. y SCOTT, A.I. (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 202-204.
- 371 - BATTERSBY, A.R., FOOKES, C.J.R., MATCHMAN, G.W.J. y McDONALD, E. (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 539 - 541.
- 372 - SCOTT, A.I., BURTON, G., JORDAN, P.M., MATSUMOTO, H., FAGERNESS, P.E. y PRYDE, L.M. (1980) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 384-387.
- 373 - SCOTT, A.I., ROESSNER, C.A., STOLOWICH, N.J., KARUSO, P., WILLIAMS, H.J., GRANT, S.K., GONZALEZ, M.D. y HOSHINO, T. (1988) *Biochemistry* 27, 7984-7990.
- 374 - ROSE, S., FRYDMAN, R.B., SANTOS, C., SBURLATI, A., VALASINAS, A., y FRYDMAN, B. (1988) *Biochemistry* 27, 4871-4880.
- 375 - JORDAN, P.M. y SEEHRA, J.S. (1979) *FEBS Lett.* 104, 364-366.
- 376 - SEEHRA, J.S. y JORDAN, P.M. (1980) *J. Am. Chem. Soc.* 102, 6841-6846.
- 377 - BERRY, A., JORDAN, P.M. y SEEHRA, J.S. (1981) *FEBS Lett.* 129, 220-224.
- 378 - JORDAN, P.M. y BERRY, A. (1981) *Biochem. J.* 195, 177-181.
- 379 - WARREN, M.J. y JORDAN, P.M. (1988) *Biochemistry*, 27, 9020-9030.
- 380 - MEISLER, M., WANNER, L., EDDY, R.E. y SHOWS, J.B. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 170-176.
- 381 - WANG, A.L., ARREDONDO-VEGA, F.X., GIAMPIETRO, P.F., SMITH, M., ANDERSON, W.F. y DESNICK, R.J. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 5734-5738.

- 382 - GRANDCHAMP, B., ROMEO, P.H., DUBART, A., RAICH, N., ROSA, J., NORDMANN, Y. y GROOSENS, M. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 5063-5040.
- 383 - RAICH, N., ROMEO, P.H., DUBART, A., BEAPAIN, D., COHEN-SOLAL, M. y GROOSENS, M. (1986) Nucleic Acids Res. 14, 5955-5968.
- 384 - GRANDCHAMP, B., De VERNEUIL, H., BEAMONT, C., CHRETIEN, S., WALTER, O. y NORDMANN, Y. (1987) Eur. J. Biochem. 162, 105-110.
- 385 - CHRETIEN, S., DUBART, A., BEAUPIN, D., RAICH, N., GRANDCHAMP, B., ROSA, J., GROOSENS, M. y ROMEO, P.H. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6-10.
- 386 - GRANDCHAMP, B., BEAUMONT, C., De VERNEUIL, H., WALTER, O. y NORDMANN, Y. (1985) en Porphyrins and Porphyrins, (Nordmann, Y., ed.) pp. 35-44, John Libbey, Paris.
- 387 - ROMEO, P.H., RAICH, N., DUBART, A., BEAUPIN, D., MATTEI, M.G. y GROOSENS, M. (1985) en Porphyrins and Porphyrins, (Nordmann, Y., ed.) pp. 25-34, John Libbey, Paris.
- 388 - THOMAS, S.D. y JORDAN, P.M. (1986) Nucl. Acids Res. 14, 6215-6226.
- 389 - STUBNICER, A.C., PICAT, C. y GRANDCHAMP, B. (1988) Nucl. Acids Res. 15, 3102.
- 390 - SHARIF, A.L., SMITH, A.G. y ABELL, C. (1989) Eur. J. Biochem. 184, 353-359.
- 391 - STRAND, L.J., FELSHER, B.F., LEDEKER, A.G. y MARVER, H.S. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67 1315-1320.
- 392 - MIYAGI, K., CARDINAL, R.A., BOSSENMAIER, I. y WATSON, C.J. (1971) J. Lab. Clin. Med. 78, 683-695.
- 393 - SASSA, S., GRANICK, S., BICKERS, D.R., BRADLOW, H.L. y KAPPAS, A. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 732-736.
- 394 - KREIMER-BIRNBAUM M. y TOMIO, J.M. (1976) en Porphyrins in Human Diseases (Doss, M.B.ed.) pp 182-288, S. Karger, Basel.
- 395 - MEYER, U.A. (1973) Enzyme 14, 334-342.
- 396 - SASSA, S., SOLISH, G., LEVERE, R.D. y KAPPAS, A. (1975) J. Exp. Med. 142, 722-731.
- 397 - SASSA, S., ZALAR, G.L. y KAPPAS, A. (1978) J. Clin. Invest. 61, 499-508.
- 398 - MUSTAJOKI, P. (1986) Semin. Dermatol. 5, 155-160.
- 399 - TSCHUDY, D.P., VALSAMIS, M. y MAGNUSSEN, C.R. (1975) Ann. Intern. Med. 83, 851-864.
- 400 - PERLOTH, M., TSHUDY, D.P. MARVER, H.S., BERARD, C.W., ZEIGEL, R.F., RECHCIGL, M., Jr. y COLLINS, A. (1966) Amer. J. Med. 41, 149-162.
- 401 - NIELSEN, B. y THORN, N.A. (1965) Amer. J. Med. 38, 345-358.
- 402 - TADDEINI, L. y WATSON, C.J. (1968) Semin. Hematol. 5, 335-369.

- 403 - MOORE, M.R. y DISLER, P.B. (1983) *Adv. Drug. React. Ac. Pois. Rev.* 2, 149-189.
- 404 - LITMAN, D.A. y CORREIA, M.A. (1983) *Science* 222, 1031-1033.
- 405 - LITMAN, D.A. y CORREIA, M.A. (1985) *J. Pharm. Experim. Therapeutics* 232, 337-345.
- 406 - BADAWAY, A.A-B., MORGAN, C.J., DAVIS, M.R. (1987) *Biochem. J.* 248, 293-295.
- 407 - GIBSON, H., HARRISON, D.C. (1950) *Biochem. J.* 46, 154-156.
- 408 - SEARS, W.G., EALES, L. (1974) *Enzyme* 17, 11-20.
- 409 - GRAHAM, D.J.M., BRODIE, M.J., McCOLL, K.E.L., MOORE, M.R. y GOLDBERG, A. (1979) *Eur. J. Clin. Invest.* 9, 49-53.
- 410 - GOLDBERG, A. (1959) *Q. J. Med.* 110, 183-209.
- 411 - STEIN, J.A., BLOOMER, J.R. BERK, P.D. CORCORAN, P.L. y TSCHUDY, D.P. (1970)
- 412 - TADDEINI, L., NORDSTROM, K.L., WATSON, C.J. (1964) *Metabolism.* 13, 691-701.
- 413 - HOLLANDER, C.S., SCOTT, R.L., TSCHUDY, D.P. PERLOTH, M. WAXMAN, A. y STERLING, K. (1967). *N. Engl. J. Med.* 277, 995-1000.
- 414 - VAVRA, J.D. y AVIOLI, L.V. (1982) *Arch. Intern. Med.* 142, 1527-1529.
- 415 - DOSS, M. y VERSPHOHL, F. (1981) *Klin. Wochenschr.* 59, 727-735.
- 416 - WALDENSTRÖM, J. (1937) *Acta Med. Scan. Suppl.* 82, 1-254.
- 417 - LAMON, J.M., FRYKHOLM, B.C. y TSCHUDY, D.P. (1979) *J. Med. Genet.* 16, 134-139.
- 418 - ANDERSON, P.M., REDDY, R.M., ANDERSON, K.E. y DESNICK, R.J. (1981) *J. Clin. Invest.* 68, 1-12.
- 419 - DESNICK, R.J., OSTASIEWICZ, L.T. TISHLER, P.A. y MUSSTAJOKI, P. (1985) *J. Clin. Invest.* 76, 865-874.
- 420 - WILSON, J.H.P., de ROOIJ, F.W.M. y te VELDE, K. (1986) *Neth. J. Med.* 29, 393-399.
- 421 - NUNN, A.V.W., GARDNER, L.C. y COX, T.M. (1987) *Q.J. Med.* 64, 589-599.
- 422 - LANNFELT, L., WETTERBERG, L., GELLEFORS, P., LILIUS, L., FLODERUS, Y. y THUNELL, S. (1989) *J. Clin. Chem. Biochem.* 27, 857-862.
- 423 - LLEWELLYN, D.H., ELDER, G.H., KALSHEKER, N.A., MARSH, D.W.N., HARRISSON, P.R., GRANDCHAMP, B., PICAT, C., NORDMANN, Y., ROMEO, P.H. y BROOSSENS, M. (1987) *Lancet* *ii*, 706-708.
- 424 - LEE, J.S., ANVRET, M., LINDSTEN, J., LANNFELT, L., GELLERFORS, P., WETTERBERG, L., FLODERUS, Y. y THUNELL, S. (1988) *Hum. Genet.*, 79, 379-381.
- 425 - GRANDCHAMP, B., PICAT, C., MIGNOTTE, V., WILSON, J.H.P., te VELDE, K., SANDKUYL, L., ROMEO, P.H., BROOSSENS M. y NORDMANN, Y. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 661-664.

- 426 - GRANDCHAMP, B., PICAT, C., KAUPPEINEN, R., MIGNOTTE, V., PELTONEN, L., MUSTAJOKI, P., ROMEO, P.H., GOOSSENS, M. y NORDMANN, Y. (1989) *Eur. J. Clin. Invest.* 19, 415-418.
- 427 - LLEWELYN, D.H., URQUHART, A., SCOBIE, G., ELDER, G.H., KALSHEKER, N.A. y HARRISON, P.R. (1988) *Biochem. Soc. Trans.* 16, 799-800.
- 428 - GRANDCHAMP, B., PICAT, C. de ROOIJ, F., BAUMONT, C., WILSON, P., DEYBACH, J.C. y NORDMANN, Y. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17, 6637-6649.
- 429 - WATSON, C.J. y SCHARTZ, S. (1941) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47, 393-394.
- 430 - MAUZERALL, D. y GRANICK, S. (1956) *J. Biol. Chem.* 219, 435-446.
- 431 - GRELIER, M., GRANDCHAMP, B., PHUNG, N., DE VERNEUIL, H., NOIRE, J., NORDMANN, Y., HUSQUINET, H. y DODINVAL P. (1977) *Nouv. Presse. Med.* 6, 1045-1047.
- 432 - McCOLL, K.E.L., MOORE, M.R., THOMPSON, G.G y GOLDBERG, A. (1982) *J. Med. Genet.* 19, 271-276.
- 433 - MAGNUSSEN, R.C., LEVINE, J.B., DOHERTY, J.M., CHEESMAN, J.O. y TSHUDY, D.P. (1974) *Blood.* 44, 857-868.
- 434 - PETERSON, L.R., HAMERNYK, P., BIRD, T.D. y LLABE, R.F. (1976) *Clin. Chem.* 22, 1835-1840.
- 435 - BONKOWSKY, H.L. y BOTTOMLEY, S.S. (1977) *Clin. Res.*, 25, 322.
- 436 - BATTLE, A.M. del C., WILDER de XIFRA, E.A., STELLA, A.M. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 871-875.
- 437 - ASTRUP, E.G. (1978) *Clin. Sci. Mol. Med.* 34, 251-256.
- 438 - BOTTOMLEY, S.S., BONKOWSKY, H.L., KREIMER-BIRNBAUM, M. (1981) *Am. J. Clin. Pathol.* 76, 1227-1228.
- 439 - WITH, T.K. y PEDERSEN, J.S. (1981) *Dan. Med. Bull.* 28, 27-34.
- 440 - MUSTAJOKI, P. (1981) *Ann. Inter. Med.* 95, 162-166.
- 441 - SASSA, S. y BERSTEIN, S.E. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1181-1184.
- 442 - ANDERSON, K.E., SASSA, S., PETERSON, C.M. y KAPPAS, A. (1977) *Am. J. Med.* 63, 359-364.
- 443 - BLUN, M., KOEL, C. y ABECASSIS, J. (1978) *Clin. Chim. Acta* 87, 119-125.
- 444 - EPSTEIN, O., LAHAV, M., SCHOENFELD, N., NEMESH, L., SHAKLAI, M. y ATSMON, A. (1983) *Cancer* 52, 828-832.
- 445 - ANDRIOLO, A., NOCELIN, A.J., STELLA, S.R., AJZEN, H. y RAMOS, O.L. (1980) *Clin. Chim. Acta* 104, 241-244.
- 446 - NORDMANN, GRANDCHAMP, B., GRELIER, M., PHUNG, N. y DE VERNEUIL, H. (1976) *Lancet*, ii, 201-202.
- 447 - LANMFELT, L., WETTERBERG, L., LILLIUS, L., THUNELL, S. y GELLERFORS, P. (1989) *Clin. Chim. Acta* 183, 227 - 238.
- 448 - LANMFELT, L. (1990) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 28, 273-278.

- 449 - TSCHUDY, D.P. y LANGON, J.P. (1980) en *Metabolic Control and Disease* (Bondy, P.K., Rosenberg, L.E. eds.). Saunders and. Co. Philadelphia.
- 450 - PIERACH, C.A. (1982) *Semin. Liver Dis.* 2, 125-131.
- 451 - BONKOWSKY, H.L., TSCHUDY, D.P., COLLINS, A., DOHERTY, J., BOSSENMAIER, I., CARDINAL, R. y WATSON, C.J. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2725-2729.
- 452 - WATSON, C.J., PIERACH, C.A., BOSSENMAIER, J. y CARDINAL, R. (1978) *Adv. Intern. Med.* 23, 265-286.
- 453 - LAMON, J.N., FRYKHOLM, B.C., HESS, R.A. y TSHUDY, D.P. (1979) *Medicine (Baltimore)* 58, 252-268.
- 454 - McCOLL, K.E.L., MOORE, M.R., THOMPSON, G.G. y GOLDBERG, A. (1981) *Q. J. Med.* 198, 161-174.
- 455 - MORRIS, D.L., DUDLEY, M.D. y PEARSON, R.D. (1981) *Ann. Intern. Med.* 95, 700-701.
- 456 - GLUCK, R., GREEN, D., COHEN, I. y TS'AO, C. (1983) *Blood* 61, 243-249.
- 457 - PIERACH, C.A. (1986) en *Porphyrins and Porphyrins*, (Nordmann, Y.ed.) pp. 217-224, John Libbey Eurotex Ltd. Paris.
- 458 - JUSIC, A., SOSTARKO, M. y MAJIC, D. (1976) *Eur. Neurol.* 14, 294-301.
- 459 - DOUER, D., WEINBERGER, A., PINKLAS, J. y ATSMON (1978) *J.A.M.A.* 240, 766-768.
- 460 - WIDER de XIFRA, E.A., BATTLE, A.M. del C., STELLA, A.M. y MALANUD, S. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 819 - 822.
- 461 - ANDERSON, K.E., SPITZ, I.M., SASSA, S., BARDIN, W. y KAPPAS, A. (1984) *N. Engl. J. Med.* 311, 643-645.
- 462 - ANDERSON, K.E., SPITZ, I.M., BARDIN, C.W. y KAPPAS, A. (1986) en *Porphyrins and Porphyrins* (Nordmann, Y., ed.) pp. 217-224, John Libbey Eurotex Ltd., Paris.
- 463 - DOSS, M. (1970) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 8, 197-207.
- 464 - URATA, G. y GRANICK, S (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 811-820.
- 465 - LOWRY, O.H., ROSENBOUGH, N., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 466 - WARBURG, O. y CHRISTIAN, W. (1941) *Biochem. Z.* 310, 384-421.
- 467 - KALCKAR, H.M. (1974) *J. Biol. Chem.* 196, 461-475.
- 468 - THORNE, C.J.R., (1978) en *Techniques in the Life Sciences* (Kornberg, H.L., Metcalfe, J.C., Northcote, D.H. Pogson, C.I. y Tipton, K.F. eds.) B104, pp. 1-18, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Ireland.
- 469 - CROSBY, W.H. y FURTH, F.W. (1956) *Blood* 11, 380-383.
- 470 - EFREMOV, G.D., HUISMAN, T.H.J., BROWMAN, K., WRIGHSTONE, R.W. y SCHROEDER, W.A. (1974) *J. Lab. Clin. Med.* 83, 657-667.

- 471 - DAVIS, B.J. (1964) Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427.
- 472 - MILES LABORATORIES INC. (1950) en Canalco Sage Kit, Elkhart, USA.
- 473 - REISNER, A.H., NEMIS, P. y BUCHHOLTZ, C. (1975) Anal. Biochem. 64, 509-516.
- 474 - LAEMMLI, U.K. (1970) Nature (Lond.) 222, 680-685.
- 475 - ANDREWS, P. (1964) Biochem. J. 91, 222-233.
- 476 - LAURENT, T.C. y KILLANDER, J. (1964) J. Chromatogr. 14, 317-330.
- 477 - TERENCE, H.F., ROSELLINO, E. y PASSERON, S. (1971) Eur. J. Biochem. 18, 342-346.
- 478 - WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION (1972) Worthington Enzyme Manual, Freehold, New Jersey.
- 479 - MAEHLY, A. y CHANCE, B. (1975) en Methods in Enzymology (Colowick, S.P. y Kaplan, N.O. eds.) Vol.2 pp.764-813, Academic Press, New York.
- 480 - MARTIN, R.G. y AMES, B.N. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1372-1379.
- 481 - SIEGEL, L.M. y MONTY, K.J. (1966) Biochim. Biophys. Acta 112, 346-362.
- 482 - PERRIN, J. (1936) J. Phys. Radium 7, 1-14.
- 483 - NEURATH, H. (1939) J. Am. Chem. Soc. 61, 1841-1844.
- 484 - PHARMACIA FINE CHEMICALS (1982) Isoelectric Focusing, Uppsala, Sweden.
- 485 - LINEWEAVER, H. y BURK, D. (1934) J. Am. Chem. Soc. 56, 658-670.
- 486 - WOLFENSTEIN, C.E.M., SANTONE, J.A. y PALADINI, A.C. (1966) Acta Physiol. Latinoam. 16, 194-202.
- 487 - HIRS, C.H.W. (1956) J. Biol. Chem. 219, 611-621.
- 488 - OUCHTERLONY, O. (1964) Coll. Ges. Physiol. Chem. 15, 15-35.
- 489 - LAURELL, C.-B. (1966) Anal. Biochem. 15, 45-52.
- 490 - TOMIO, J.M. y SAN MARTIN de VIALE, L.C. (1972) Bioquim. Clin. 3, 217-245.
- 491 - SAN MARTIN de VIALE, L.C. y TOMIO, J.M. (1972) Bioquim. Clin. 3, 246-276.
- 492 - SCHWARTZ, S.M., BERG, M., BOSSENMEIER, I. y DINSMORE, M. (1960) en Methods of Biochemical Analysis (Glick, D.ed.) Vol.8, pp. 221-293, Interscience, New York.
- 493 - FISHER, H. (1955) Org. Syn. 3 442-447.
- 494 - WATSON, C.J., DHAR, G.J., BOSSENMAIER, I., CARDINAL, R. y PETRIKA, C.J. (1973) Ann. Intern. Med. 79, 80-83.



- 495 - SEGEL, I.H. (1975) en *Enzyme Kinetics*, pp. 884-926, J. Willey and Sons, New York.
- 496 - REESE, J.A. y BYARD, J.L. (1981) *In Vitro* 17, 935-940.
- 497 - FRY, J.R., JONES, C.A., WIEBKIN, P., BELLEMAN, P. y BRIDGES, J.W. (1976) *Anal. Biochem.* 71, 341-350.
- 498 - SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. en *Biometry* (1981) pp. 429-445, Ed. Freeman, W.N. and Co., San Francisco.
- 499 - MIGUEL MERINO, F. de (1974) *Biochem. J.* 143, 93-95.
- 500 - DIXON, M. y WEBB, E.C. en *Enzymes* (1964) pp.116-166, Longman Group Limited. London.
- 501 - BEAUMONT, C., PORCHER, C., PICAT, C., NORDMANN, Y. y GRANDCHAMP, B. (1989) *J. Biol. Chem.* 26, 14829-14834.
- 502 - IRVING, H. y WILLIAMS, R.J.P. (1953) *J. Chem. Soc.* 3192-3210.
- 503 - PEARSON, R.G. (1968) *J. Chem. Educ.* 45, 141-147.
- 504 - KLOPMAN, G. (1968) *J. Am. Chem. Soc.* 90, 223-234.
- 505 - HUHEEY, J.E. (1975) en *Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity*, SI Unit Edition, Harper and Row Publishers, London.