

Tesis de Posgrado

Acción fotodinámica y no fotodinámica de las porfirinas sobre enzimas de las biosíntesis del hemo y de otros caminos metabólicos

Afonso, Susana Graciela

1992

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:

Afonso, Susana Graciela. (1992). Acción fotodinámica y no fotodinámica de las porfirinas sobre enzimas de las biosíntesis del hemo y de otros caminos metabólicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2495_Afonso.pdf

Cita tipo Chicago:

Afonso, Susana Graciela. "Acción fotodinámica y no fotodinámica de las porfirinas sobre enzimas de las biosíntesis del hemo y de otros caminos metabólicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1992.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2495_Afonso.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis
2495
ej.2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ACCION FOTODINAMICA Y NO FOTODINAMICA
DE PORFIRINAS SOBRE ENZIMAS DE LA BIOSINTESIS
DEL HEMO Y DE OTROS CAMINOS METABOLICOS**

SUSANA GRACIELA AFONSO



TE

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ACCION FOTODINAMICA Y NO FOTODINAMICA DE LAS PORFIRINAS
SOBRE ENZIMAS DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO
Y DE OTROS CAMINOS METABOLICOS

por

SUSANA GRACIELA AFONSO

DIRECTOR: Dra. Alcira María del Carmen Batlle
CO-DIRECTOR: Dr. Rafael Enríquez de Salamanca
CONSEJERO: Dra. Alcira María del Carmen Batlle

LUGAR DE TRABAJO: Centro de Investigaciones sobre
Porfirinas y Porfirias (CIPYP), Departamento de Química
Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos
Aires (Argentina); y Unidad de Porfirias, Hospital Clínico
Universitario San Carlos, Madrid (España)

Tesis presentada para optar al título de:

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

Tesis
2495.
2
;

a mi familia

a Ana, Elba y César

INDICE GENERAL

Página

AGRADECIMIENTOS

ABREVIATURAS

OBJETIVOS

v

INTRODUCCION

1

- CAPITULO I: CAMINO METABOLICO DEL HEMO

1

I.1. Porfirinas

1

I.2. Biosíntesis del hemo

4

I.3. Enzimas del camino metabólico del hemo

5

I.4. Biodegradación del hemo

19

I.5. Control de la biosíntesis del hemo

21

- CAPITULO II: PORFIRIAS

29

II.1. Clasificación de las porfirias

29

II.2. Porfirias agudas

29

II.3. Porfirias cutáneas

33

II.4. Porfirias mixtas

37

- CAPITULO III: FOTODINAMICA Y PORFIRINAS

40

III.1. Fotoquímica y fotobiología

40

III.2. Patrones de fototoxicidad en las porfirias

44

III.3. Fotosensibilidad porfírica

45

III.4. Estudios *in vitro* de la sensibilización foto-
química por porfirinas

48

	Página
MATERIALES Y METODOS	51
- CAPITULO I: MATERIALES	51
I.1. Equipos utilizados	51
I.2. Fuentes enzimáticas	52
I.3. Secuestradores y fotosensibilizadores	52
I.4. Aminoácidos	53
I.5. Reactivos	53
- CAPITULO II: METODOS	54
II.1. Preparación de porfirinas libres	54
II.2. Preparación de los tejidos	55
II.3. Purificación de las enzimas provenientes de glóbulos rojos	56
II.4. Tratamiento de las enzimas	61
II.5. Determinaciones enzimáticas	66
II.6. Determinación de proteínas	72
II.7. Determinación de grupos sulfhidrilos totales	72
II.8. Determinación de grupos amino libres	73
II.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida	73
RESULTADOS Y DISCUSION	76
- CAPITULO I: ACCION FOTODINAMICA Y NO FOTODINAMICA DE LAS PORFIRINAS	76
I.1. Acción de URO I sobre la actividad de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D en distintas condi <u>ci</u> ciones experimentales	77
I.2. Efecto de URO I sobre otras enzimas	91
I.3. Conclusiones	98

- CAPITULO II: EFECTO DE DISTINTOS FOTSENSIBILIZADORES SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALA-D, PBGasa, DEAMINASA Y URO-D	100
II.1. Luminol	101
II.2. Riboflavina	104
II.3. Rosa de Bengala y azul de metileno	105
II.4. URO I y luz blanca	110
II.5. Conclusiones	110
- CAPITULO III: ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE INACTIVACION FOTODINAMICA Y NO FOTODINA MICA POR URO I	112
III.1. Secuestradores de especies reactivas generadas según el mecanismo tipo II	116
III.2. Secuestradores de especies reactivas generadas según el mecanismo tipo I	116
III.3. Efecto del peróxido de hidrógeno	124
III.4. Modificadores de la reacción de Fenton	125
III.5. Mecanismo propuesto	130
III.6. Conclusiones	134
- CAPITULO IV: CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA MOLECULAR PROTEICA POR EFECTOS DE LA ACCION FOTODINAMICA Y NO FOTODINAMICA DE URO I	135
IV.1. Tratamiento de las enzimas purificadas	136
IV.2. Estudios químicos	137
IV.3. Estudios espectroscópicos	141
IV.4. Estudios electroforéticos	154
IV.5. Conclusiones	161

CONCLUSIONES FINALES

REFERENCIAS

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

- a mi directora, la Dra. Alcira María del Carmen Batlle, por haberme brindado su apoyo e invaluable experiencia.
- al Dr. Rafael Enriquez de Salamanca, por haber asumido la co-di-rección de este trabajo, y por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo en la Unidad de Porfirias del Hospital Clínico San Carlos.
- a la Dra. Sagrario Chinarro, por su colaboración científica y por el apoyo moral que me brindó durante mi permanencia en Madrid.
- al Dr. Emilio Díez, de la Unidad de Lípidos y Aterosclerosis del Hospital Clínico San Carlos, por la colaboración prestada en algunas experiencias.
- a todos los integrantes de la Unidad de Porfirias del Hospital Clínico San Carlos, en especial a las Dras. Ana Leñero y Carmen Moreno, por su continuo aliento y simpatía.
- a mis compañeros y amigos, Ana María Buzaleh, Elba Vázquez y César Polo, que me brindaron su experiencia y colaboración en la confección y corrección de los manuscritos y en la realización de algunas de las experiencias presentadas; quiero hacer extensivo este agradecimiento a la Dra. Nora Navone.
- a la Dra. Ana María Buzaleh, por el esmero y dedicación puestos al transcribir los manuscritos.
- a todos los integrantes del CIPYP, que hicieron grata mi tarea con su aliento y compañerismo.
- a la Unidad de Hemoterapia del Hospital Clínico San Carlos y a los Dres. Codoro (Hospital Zubizarreta) y Regnasco (Hospital

Pirovano), por suministrarme gentilmente la fuente enzimática.

Finalmente, deseo agradecer al Instituto de Cooperación Iberoamericana, a la Universidad de Buenos Aires y al CONICET, por los subsidios otorgados para la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

ALA	Acido δ -aminolevúlico
ALA-D	δ -Aminolevúlico dehidrasa
ALA-S	δ -Aminolevúlico sintetasa
AM	Azul de metileno
ATP	Adenosina trifosfato
BHT	Hidroxitolueno butilado
CPGasa	Coproporfirinogenasa
COPRO	Coproporfirina
COPROgen	Coproporfirinógeno
CPH	Coproporfiria hereditaria
DEAE	Dietilaminoetil
DETAPAC	Acido dietilentetraaminpentaacético
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOVA	Acido γ - δ -dioxoalérico
DOVA-T	DOVA transaminasa
DS	Desviación estándar
DTNB	Acido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)
EDTA	Acido etilendiamintetraacético
Fe-Quel	Ferroquelatasa
FIRIA	Heptaporfirina
GLDH	Glutámico deshidrogenasa
GR	Glóbulos rojos
GSH	Glutation
HCB	Hexaclorobenceno
HEXA	Hexaporfirina
HOM	Hemo oxigenasa microsomal
HP	Hematoporfirina
LDH	Láctico deshidrogenasa
MESO	Mesoporfirina
NPA	Nueva porfiria aguda

PAI	Porfiria aguda intermitente
PBG	Porfobilinógeno
PBGasa	Porfobilinogenasa
PCT	Porfiria cutanea tarda
PENTA	Pentaporfirina
PPE	Protoporfiria eritropoyética
PPGasa	Protoporfirinógeno oxidasa
PPy	Fosfato de piridoxal
PROTO	Protoporfirina
PROTOgen	Protoporfirinógeno
PV	Porfiria variegata
RB	Rosa de Bengala
Rf	Riboflavina
Rp	<i>Rhodopseudomonas</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SOD	Superóxido dismutasa
Suc.CoA-S	Succinil CoA sintetasa
α -T	α -Tocoferol
TCA	Acido tricloroacético
TCDD	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
TFD	Terapia fotodinámica
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
URO	Uroporfirina
URO-D	Uroporfirinógeno decarboxilasa
UROgen	Uroporfirinógeno
UV	Ultravioleta

OBJETIVOS

La fotosensibilización de biomoléculas es un fenómeno conocido desde principios de siglo, y se sabe que requiere la presencia de oxígeno y de un compuesto con propiedades fotosensibilizantes.

Las porfirinas son eficientes sensibilizadores, por lo cual son muy importantes en fotobiología y fotomedicina. La acumulación de porfirinas en células, como resultado de alteraciones en el metabolismo del hemo o provenientes de inyecciones endovenosas de estos tetrapirroles, conduce a la fotosensibilización de la piel característica de los pacientes con porfiria cutánea o bajo tratamiento con terapia fotodinámica.

Se sabe, actualmente, que las porfirinas ejercen, además, un efecto fotodinámico sobre proteínas y lípidos de membrana, que conduce a la desorganización y pérdida de la función celular. También se ha reportado la fotoinactivación de algunas enzimas, pero muy poco se sabe sobre el efecto de los tetrapirroles en la oscuridad.

El objetivo de la presente Tesis fue investigar la acción de la uroporfirina I (URO I) sobre algunas enzimas del camino biosintético del hemo y de otros caminos metabólicos, tanto en oscuridad como en iluminación con luz UV; comparando, además, el efecto de URO I con el de diversas porfirinas y de otros fotosensibilizadores no tetrapirrólicos.

Para tratar de elucidar el mecanismo químico de la acción fotodinámica de la URO I, se decidió llevar a cabo un estudio con secuestradores ("scavengers") específicos de distintas especies reactivas de oxígeno.

Con el objeto de investigar las alteraciones moleculares inducidas por la acción fotodinámica y no fotodinámica de URO I,

se realizaron estudios químicos, espectroscópicos y electroforéticos de δ -aminolevúlico dehidrasa, porfobilinogenasa, deaminasa y uroporfirinógeno decarboxilasa purificadas de eritrocitos humanos.

INTRODUCCION

CAPITULO I

CAMINO METABOLICO DEL HEMO

	Página
I.1. Porphirinas	1
I.2. Biosíntesis del hemo	4
I.3. Enzimas del camino metabólico del hemo	5
I.3.1. δ -Aminolevúlico sintetasa	5
I.3.2. δ -Aminolevúlico dehidrasa	9
I.3.3. Porfobilinogenasa	11
I.3.4. Uroporfirinógeno decarboxilasa	13
I.3.5. Coproporfirinogenasa	14
I.3.6. Protoporfirinogenasa	16
I.3.7. Ferroquelatasa	17
I.4. Biodegradación del hemo	19
I.5. Control de la biosíntesis del hemo	21
I.5.1. Rol del ALA-S y su control por hemo	22
I.5.2. Control por localización tisular y subcelular	25
I.5.3. Control por interconexión con otros caminos metabólicos	26

I. CAMINO METABOLICO DEL HEMO

I.1. PORFIRINAS

Las porfirinas se encuentran ubicuamente distribuídas en la naturaleza; juegan su rol principal en el control de las oxida ciones biológicas y en el transporte de oxígeno, aunque también participan de otras reacciones tan diversas como las que producen la coloración de plumas de ciertos pájaros y cáscaras de huevos (Rimington, 1939; With, 1973).

El núcleo básico de las porfirinas (Figura I.1.) es una estructura biológica única consistente en un macrociclo de cuatro anillos pirrólicos unidos por cuatro puentes metino. La existencia de dobles enlaces alternados en los 16 átomos de carbono internos del anillo tetrapirrólico da lugar a una molécula plana, resonante y altamente resistente a modificaciones químicas. Los cuatro anillos pirrólicos se denominan A, B, C y D, y los puentes metino son α , β , γ y δ . En esta rígida estructura planar se encuentran ocho cadenas laterales unidas en las posiciones 1 a 8 según la nomenclatura de Fischer, el tipo de cadena lateral determi na las características físicas de las porfirinas.

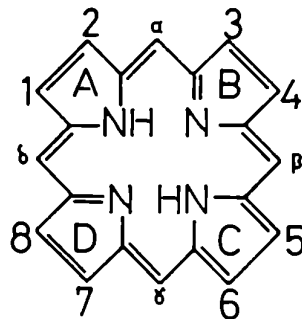


FIGURA I.1.: Núcleo porfirina

El metabolito biológicamente activo o fisiológico no lo constituye este compuesto altamente conjugado sino la hexahidroporfirina, o porfirinógeno (Figura I.2.), en la cual los puentes metino se encuentran reducidos. A diferencia de las porfirinas, que son fluorescentes, los porfirinógenos son compuestos incoloros, no conjugados, y no fluorescen, pero se oxidan espontáneamente a las correspondientes porfirinas.

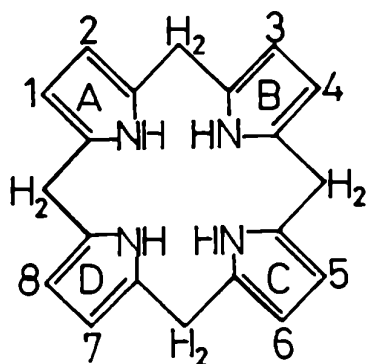


FIGURA I.2.: Estructura de los porfirinógenos

Para la uroporfirina (URO) y la coproporfirina (COPRO) pueden encontrarse cuatro isómeros posibles: I, II, III y IV, según las posiciones relativas de los dos sustituyentes, acetilo y propionilo, en los carbonos β del pirrol (Figura I.3.). Hasta el momento, en la naturaleza sólo se han hallado los isómeros I y III, únicamente el tipo III es el que lleva finalmente a protoporfirina IX (PROTO) y hemo; los isómeros I son productos de síntesis anormal en el camino metabólico de las porfirinas.

Las porfirinas se combinan fácilmente con metales dando lugar a quelatos, que forman parte de la estructura de compuestos de gran importancia biológica, como por ejemplo:

- Hemoglobina y mioglobina, que contienen hierro en estado ferroso.

- Clorofila y bacterioclorofila, que poseen magnesio en su estructura.
- Citocromos, que contienen hierro capaz de oxidarse y reducirse alternativamente.
- Cobalaminas o corrininas, que son derivados de las porfirinas complejados con cobalto.

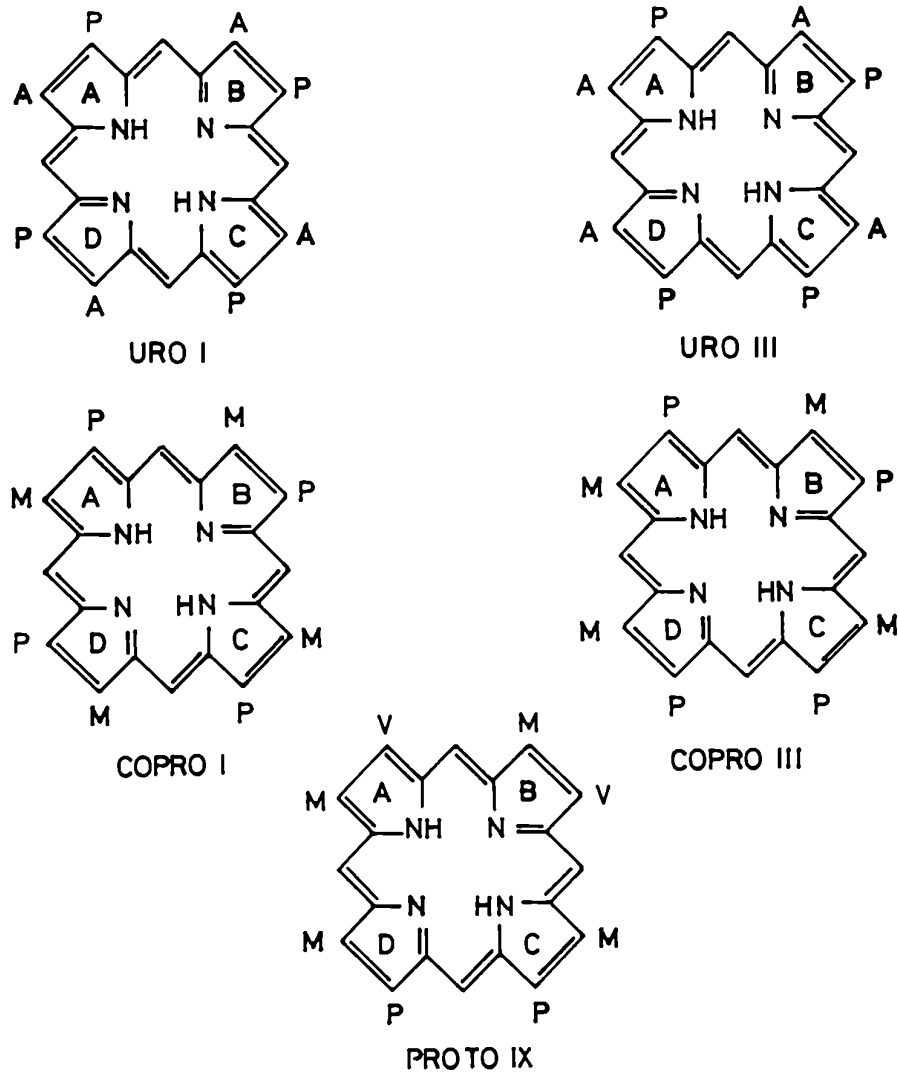


FIGURA I.3.: Estructura de los isómeros de URO, COPRO y PROTO
 A: acetilo, M: metilo, P: propionilo, V: vinilo

Las hemoproteínas son aquellas proteínas que contienen como grupo prostético un quelato tetrapirrólico de hierro. En muchas hemoproteínas, el protohemo se une a la proteína específica por coordinación entre el átomo de hierro y los átomos de nitrógeno de las cadenas laterales básicas de la proteína. En otras hemoproteínas, como el citocromo c, existen uniones covalentes adicionales entre las cadenas laterales de la porfirina y los residuos aminoácido. Entre las hemoproteínas se encuentran también enzimas como las peroxidasas, catalasa y triptofano pirrolasa.

I.2. BIOSINTESIS DEL HEMO

La capacidad de sintetizar hemo es común a todas las células aeróbicas de animales, plantas y bacterias. La elucidación de la secuencia de reacciones involucradas en este camino biosintético (Figura I.4.) ha sido el resultado de una serie de importantes trabajos realizados con marcadores isotópicos en los laboratorios de Shemin, Rimington, Granick y Neuberger (Cookson y Rimington, 1953; Granick y Bogorad, 1953; Shemin y Russell, 1953; Neuberger y Scott, 1953; Rimington y Krol, 1955).

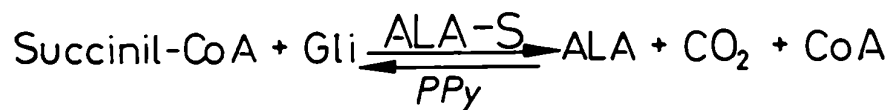
Hay ocho enzimas involucradas en la biosíntesis del hemo (Tabla I.1.), la primera y las tres últimas están confinadas en la mitocondria, mientras que las restantes son citosólicas (Figura I.4.). La síntesis de hemo comienza con la unión de las pequeñas moléculas glicina y succinil-CoA, derivadas del ciclo de Krebs, las cuales, por acción de la δ -aminolevúlico sintetasa (ALA-S) forman una molécula de ácido δ -aminolevúlico (ALA). La biosíntesis continúa con la formación del monopirrol porfobilinógeno (PBG), a partir de dos moléculas de ALA en presencia de δ -aminolevúlico dehidrasa (ALA-D). Por la acción combinada de dos enzimas se forma uroporfirinógeno (UROgen); la PBG deaminasa o hidroximetilbilano sintetasa une cuatro moléculas de PBG por condensación secuencial "cabeza-cola", para dar el tetrapirrol de cadena

abierta hidroximetilbilano, con sus β sustituyentes simétricos, el cual, en ausencia de la segunda enzima, isomerasa, tiende a ciclarse para formar el UROgen I. En presencia de isomerasa el pírrol D es invertido antes de la ciclación, formándose así la estructura asimétrica del UROgen III. El siguiente paso es la decarboxilación secuencial de los cuatro grupos acetilo del UROgen III por la uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D) para obtener el coproporfirinógeno (COPROgen III). La URO-D también puede actuar sobre el UROgen I para formar COPROgen I, pero sólo el COPROgen III es decarboxilado oxidativamente a protoporfirinógeno (PROTOgen) IX por la coproporfirinogenasa (CPGasa) mitocondrial. Por lo tanto, los isómeros de la serie I, que se producen normalmente en muy baja concentración, son excretados sin posteriores modificaciones. En el siguiente paso de la biosíntesis seis átomos de hidrógeno son eliminados del PROTOgen IX por la protoporfirinógeno oxidasa (PPGasa) para dar PROTO IX. Finalmente, un ión ferroso es insertado en el anillo porfirina por acción de la ferroquelatasa (Fe-Quel) o hemosintetasa, obteniéndose el producto final, hemo.

I.3. ENZIMAS DEL CAMINO METABOLICO DEL HEMO

I.3.1. δ -Aminolevúlico sintetasa

El ALA se forma a partir de glicina y succinil-CoA de acuerdo con la siguiente reacción (Reacción I.1.):



Reacción I.1.

El ALA-S fue detectada originalmente en extractos de bacterias fotosintéticas (Kikuchi y col., 1958) y de eritrocitos de aves (Gibson y col., 1958). A partir de entonces la enzima ha sido medida y estudiada en diversas fuentes bacterianas y animales (Aoki y col., 1971; Margolis, 1971; Whiting y Granick, 1976; Paterniti y col., 1978; Paterniti y Beattie, 1979) pero, debido a su labilidad y su baja concentración, no se había detectado su actividad en plantas superiores hasta que se realizaron estudios en callos de soya (Wider de Xifra y col., 1971).

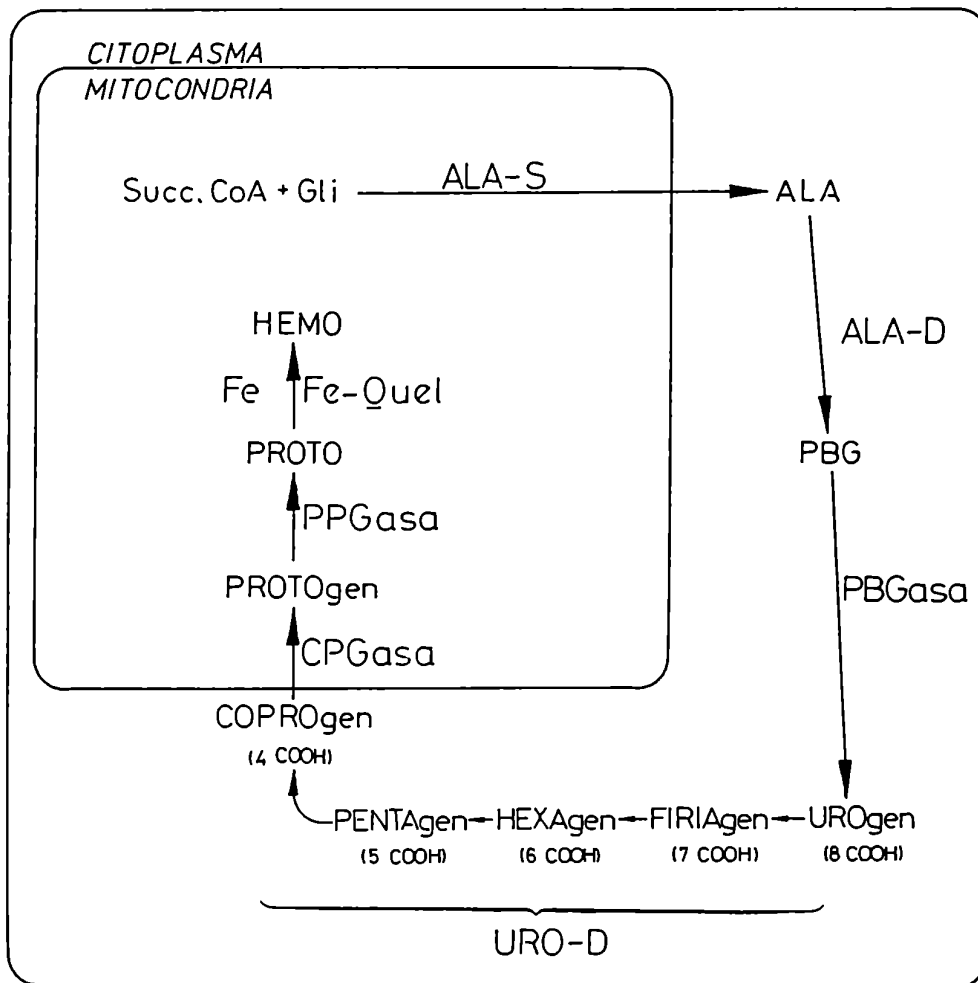


FIGURA I.4.: Camino biosintético del hemo

TABLA I.1.: Clasificación de las enzimas del camino biosintético del hemo según la numeración de la Enzyme Commission

ENZIMA	NOMBRE SISTEMATICO	CLASIFICACION
δ -ALA-Sintetasa	succinil CoA: glicina C-succiniltransferasa	2.3.1.37
Porfobilinógeno Sintetasa δ -ALA-Dehidrasa	5-aminolevulinato hidrolasa	4.2.1.24
Uroporfirinógeno I Sintetasa Porfobilinógeno Deaminasa Hidroximetilbilano Sintetasa	porfobilinógeno: amonio liasa	4.3.1.8
Uroporfirinógeno III Cosintetasa Isomerasa		4.2.1.75
Uroporfirinógeno Decarboxilasa	uroporfirinógeno III carboxilasa	4.1.1.37
Coproporfirinógeno Oxidasa Coproporfirinogenasa	coproporfirinógeno: oxígeno óxidorreductasa	1.3.3.3
Protoporfirinógeno Oxidasa		
Ferroquelatasa Hemosintetasa	protohemo ferroliasa	4.99.1.1

En la mayoría de los tejidos estudiados, el ALA-S está asociada a la fracción particulada; sin embargo, se ha encontrado baja actividad de esta enzima en otras fracciones subcelulares

(Hayashi y col., 1969; Whiting y Elliot, 1972; Patton y Beattie, 1973), que puede deberse a precursores de la enzima recientemente sintetizada en el citoplasma y en tránsito hacia la mitocondria (Granick y Sassa, 1971; Hayashi y col., 1983), ya que el ALA-S citosólica tiene un peso molecular mayor que el de la enzima mitocondrial (Scotto y col., 1983).

El ALA-S tiene una vida media muy corta *in vivo*, en mamíferos es de 90 minutos (Granick y Sassa, 1971). Su peso molecular varía entre 77.000 y 178.000 daltons debido a su gran tendencia a formar agregados consigo misma y con otras proteínas (Ohashi y Kikuchi, 1979). Los reactivos de grupos sulfhidrilos, tales como N-etilmaleimida, inhiben a la enzima purificada de *Rhodopseudomonas spheroides* (Yubisui y Yoneyama, 1972) y este efecto es parcialmente revertido por incubación de la enzima con 2-mercaptoetanol, sugiriendo la presencia de grupos sulfhidrilos esenciales necesarios para su actividad.

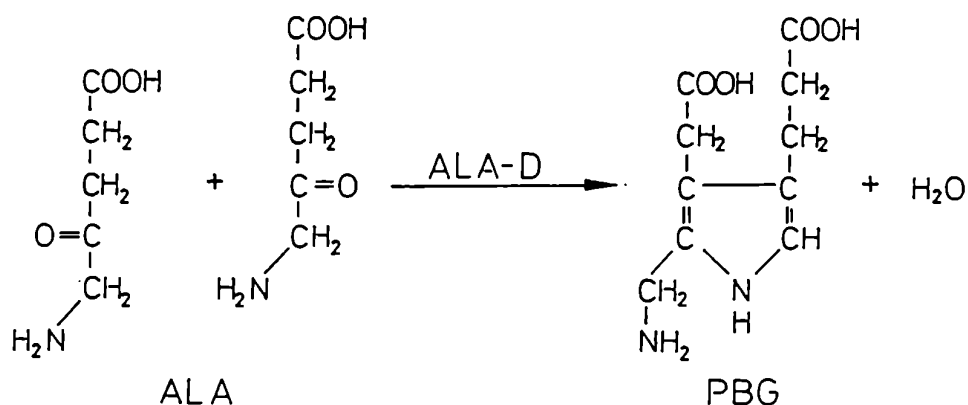
La actividad de ALA-S, por lo general la más baja comparada con las demás enzimas del camino del hemo, puede ser marcadamente alterada por diversas drogas y compuestos exógenos. En base a estas propiedades es que se le asigna a esta enzima un rol regulatorio de la síntesis del hemo (Granick y Sassa, 1971).

Aunque el ALA en mamíferos se forma normalmente por acción del ALA-S, existe en vegetales una ruta alternativa para su síntesis a partir de precursores de cinco átomos de carbono (glutamato, glutamina, α -cetoglutarato). El ácido γ - δ -dioxovalérico (DOVA), propuesto como intermediario en esta vía, origina ALA por acción de una transaminasa (DOVA-T) (Beale y col., 1975; Beale, 1978; Lombardo y col., 1989). Esta reacción no está restringida a los vegetales, ya que se ha demostrado que ocurre también en hígado bovino (Varticovsky y col., 1980) y que el DOVA marcado se incorpora en ALA y hemo en ratas (Morton y col., 1983; Mc Kinney y Ades, 1991; Singh y col., 1991). Sin embargo, debe notarse que se ha encontrado que la actividad de DOVA-T es idéntica a la de alanina-glioxalato transaminasa y que el balance energético

favorece la reacción inversa, es decir la formación de glicina (Noguchi y Mori, 1981; Shioi y col., 1984).

I.3.2. δ -Aminolevúlico dehidrasa

La formación del primer anillo aromático de esta ruta metabólica involucra la condensación de dos moléculas de ALA para dar el monopirrol PBG en una reacción catalizada por ALA-D (Granick, 1954) (Reacción I.2.).



Reacción I.2.

Esta enzima es una de las más estudiadas en el camino biosintético del hemo, y se la ha encontrado en las fuentes más diversas (Nandi y Shemin, 1968; Wilson y col., 1972; Rebeiz y Castelfranco, 1973; Müller y col., 1974; Shemin, 1976; Stella y Batlle, 1977; Stafforini y col., 1980; Chinarro y col., 1983; Paveto y col., 1989).

El ALA-D es una enzima citoplasmática, termoestable y sulfhidrónica. Excepto en callos de soya (Tigier y col., 1970), en todos los sistemas estudiados el máximo de actividad sólo puede demostrarse en presencia de compuestos tiólicos como cisteína, glutatión o ditioneitol, solos o combinados con zinc (Tsukamoto

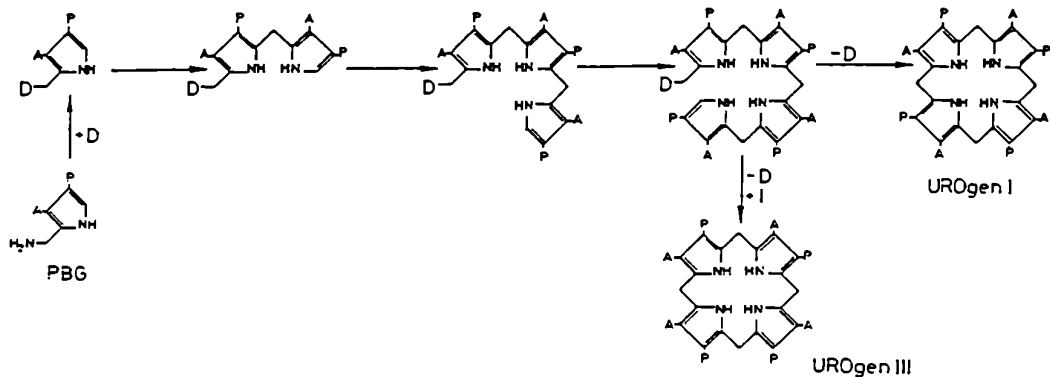
y col., 1979; Bevan y col., 1980). La actividad se pierde rápidamente por exposición al aire debido a la oxidación de los grupos sulfhidrilos, y por inhibición de estos residuos por reactivos de grupos sulfhidrilos, metales pesados o por desplazamiento del zinc por plomo o por quelación con EDTA (Granick y col., 1973; Finelli y col., 1975; Bevan y col., 1980; Moore y col., 1980 a). Se ha reportado que en el centro activo del ALA-D hay dos grupos cisteína, un zinc, uno o dos residuos lisina y uno o dos residuos histidina. Se ha postulado que los grupos histidina están involucrados en la unión del zinc al sitio catalítico y que este ión protege a los grupos sulfhidrilos esenciales de la oxidación (Tsukamoto y col., 1979; Fukuda y col., 1990).

El ALA-D es una enzima oligomérica de peso molecular 280.000 daltons, constituida por 8 subunidades similares de peso molecular 35.000 daltons. Se ha encontrado que, dependiendo de las condiciones experimentales, puede formar fácilmente agregados consigo misma, dando lugar a la existencia de especies de distinto peso molecular en equilibrio (Stafforini y col., 1980). La estructura mínima necesaria para la actividad es un dímero de peso molecular 70.000 daltons formado por dos tipos de subunidades que, aunque tienen similar composición juegan distintos roles en la síntesis de PBG (Batlle y col., 1978 a), la subunidad I estaría relacionada con la formación de una base de Schiff con una molécula de ALA (Batlle y Stella, 1978).

En la mayoría de las fuentes la cantidad y actividad de ALA-D se encuentra en gran exceso comparada con las restantes enzimas de esta ruta metabólica y, por lo tanto, tiene poca o ninguna intervención en la regulación de la velocidad de síntesis de porfirinas (Ebbon y Tait, 1969; Muthukrishnan y col., 1969; Viale, 1978).

I.3.3. Porfobilinogenasa

La ciclotetramerización de PBG a UROgen III está catalizada por el sistema enzimático porfobilinogenasa (PBGasa). Se ha establecido que se requieren al menos dos enzimas para catalizar esta reacción: PBG deaminasa, también llamada UROgen I sintetasa o hidroximetilbilano sintetasa, e isomerasa o UROgen III cosintetasa (Lockwood y Rimington, 1957). La deaminasa convierte 4 moléculas de PBG en una de UROgen I mediante condensaciones consecutivas "cabeza-cola", con eliminación de amoníaco (Reacción I.3.). En sistemas normales, por acción concertada de deaminasa e isomerasa, la orientación del anillo D es invertida para formar el intermediario fisiológico UROgen III (Batlle y Rossetti, 1977). La concentración de isomerasa determina la relación de UROgen III:I formado; generalmente esta enzima está en gran exceso, asegurando así la síntesis exclusiva del isómero III.



Reacción I.3.

La PBGasa es un sistema enzimático citoplasmático, aunque se ha encontrado actividad de PBGasa particulada en *Euglena gracilis* (Rossetti y Batlle, 1977). Tanto el complejo enzimático como sus componentes deaminasa e isomerasa, han sido aislados y purificados de células animales, vegetales y bacterianas (Batlle

y Rossetti, 1977; Miyagi y col., 1979; Anderson y Desnick, 1980). El peso molecular de deaminasa de distintas fuentes es del orden de 40.000 ± 4.000 daltons (Rossetti y col., 1980). Se ha encontrado que la fuerza iónica y la presencia de ciertos compuestos influye mucho sobre el comportamiento de la isomerasa (Sancovich y col., 1969; Llambías y Batlle, 1971 a y b) indicando que, según las condiciones experimentales, podría ocurrir la asociación de varias subunidades de la enzima, explicando así los diferentes valores de peso molecular reportados para isomerasa y para el complejo enzimático.

La deaminasa, purificada hasta homogeneidad de eritrocitos humanos (Anderson y Desnick, 1980; Fumagalli y col., 1985) y de *Euglena gracilis* (Williams y col., 1981), puede ser separada en diferentes formas y se ha propuesto que estas especies son la enzima nativa y los complejos enzima-sustrato en los cuales están unidos a la enzima los intermediarios mono, di, tri y tetrapirrólicos.

Por estudios cinéticos detallados, se ha obtenido evidencia de que la deaminasa de muchas fuentes es una enzima alostérica que contiene por lo menos dos sitios de unión de sustrato por molécula de enzima. En algunos casos se encontró cooperatividad positiva, mientras que en otros se observó una combinación de cooperatividad negativa y positiva (Sancovich y col., 1969; Llambías y Batlle, 1970 a, b; Llambías y col., 1971), indicando que la enzima puede ser regulada por su sustrato.

La actividad hepática de deaminasa es generalmente baja y frecuentemente similar a la de ALA-S (Hutton y Gross, 1970), considerada como enzima limitante de la velocidad de síntesis de porfirinas. Por esta razón, se ha propuesto que, bajo ciertas circunstancias, la deaminasa podría ser un punto de control secundario en la síntesis del hemo (Moore y col., 1980 b).

I.3.4. Uroporfirinógeno decarboxilasa

La enzima citosólica URO-D ha sido estudiada en numerosas fuentes: bacterias (Koopmann y col., 1986); tejidos animales: hígado de rata (Aragónés y col., 1972; San Martín de Viale y col., 1976 a, b; Ríos de Molina y col., 1984), hígado de pollo (Taira y San Martín de Viale, 1984), bazo de ratón (Romeo y Levin, 1971), eritrocitos de conejo (Mauzerall y Granick, 1958), eritrocitos de ave (García y col., 1973), adenocarcinoma mamario de ratón (Navone y col., 1992) y tejidos humanos: hígado (Afonso y col., 1985) y eritrocitos (Ríos de Molina y col., 1980; Afonso y col., 1985). Esta enzima cataliza la pérdida secuencial de cuatro grupos carboxilo de los sustituyentes acetilo del UROgen para dar COPROgen, con la formación de intermediarios hepta, hexa y pentacarboxílicos (Figura I.5.). La URO-D decarboxila un gran número de porfirinógenos naturales o sintéticos, pero no decarboxila las correspondientes porfirinas (Jackson y col., 1976 a; Smith y col., 1976; Smith y Francis, 1979). Los isómeros de la serie III son decarboxilados más rápidamente, seguidos en orden decreciente de velocidad por los isómeros de las series IV, II y I (Granick y Mauzerall, 1958; Cornford, 1964). Se demostró que los porfirinógenos con 7 a 5 grupos carboxilo son los verdaderos intermediarios de esta reacción (Mauzerall y Granick, 1958; Hoare y Heath, 1959; Batlle y Grinstein, 1964 a, b; San Martín de Viale y Grinstein, 1968), sugiriendo que la decarboxilación de UROgen es un proceso secuencial.

La actividad de URO-D es inhibida por compuestos tales como mercurio, cobre, iodoacetamida y p-cloromercuribenzoato (Tomio y col., 1970; Romeo y Levin, 1971). Esta inhibición puede ser revertida por el agregado de glutatión reducido (GSH) (Mauzerall y Granick, 1958; Tomio y col., 1970), indicando que la URO-D es una enzima sulfhidrónica. También el oxígeno inactiva a la URO-D, probablemente por oxidación del sustrato, aunque no se puede excluir un efecto directo sobre la enzima.

De estudios cinéticos se ha propuesto que la reacción ocurre en dos pasos, el primero de los cuales involucraría una rápida pérdida del primer grupo carboxilo en el anillo D del UROgen III, seguido por una eliminación más lenta de los restantes residuos acetilo de los anillos A, B y C (Mauzerall y Granick, 1958; Batlle y Grinstein, 1964 b; Tomio y col., 1970; García y col., 1973; Smith y Francis, 1979; De Verneuil y col., 1980; Kardish y Woods, 1980).

Aún no se ha establecido el mecanismo de acción de URO-D pero se ha demostrado que, cuando el sustrato es UROgen III, el orden de eliminación de los grupos carboxilo comienza en el anillo D y continúa en el sentido horario (Jackson y col., 1976 b) (Figura I.5.) en contraste con la decarboxilación del isómero I que parece seguir cualquiera de las dos rutas posibles (Jackson y col., 1977).

I.3.5. Coproporfirinogenasa

La conversión de COPROgen III es catalizada por la enzima mitocondrial CPGasa. La reacción involucra la decarboxilación oxidativa de dos cadenas laterales de ácido propiónico a vinilo para formar el PROTOgen IX (Figura I.6.). La enzima ha sido detectada en varias fuentes, pero la mayor información obtenida sobre sus propiedades proviene de trabajos realizados con la enzima purificada de mitocondrias de hígado (Sano y Granick, 1961; Batlle y col., 1965). La CPGasa de esta fuente requiere la presencia de oxígeno molecular para su actividad y ningún otro aceptor de electrones puede reemplazar al oxígeno. La enzima actúa sobre los isómeros III y IV del COPROgen pero no sobre los tipos I y II.

La CPGasa de hígado de rata ha sido purificada hasta homogeneidad observándose un peso molecular de 80.000 daltons (Batlle y col., 1965). La enzima de levadura (Poulson y Polglase, 1974) y de hígado bovino (Yoshinaga y Sano, 1980) tienen pesos moleculares similares.

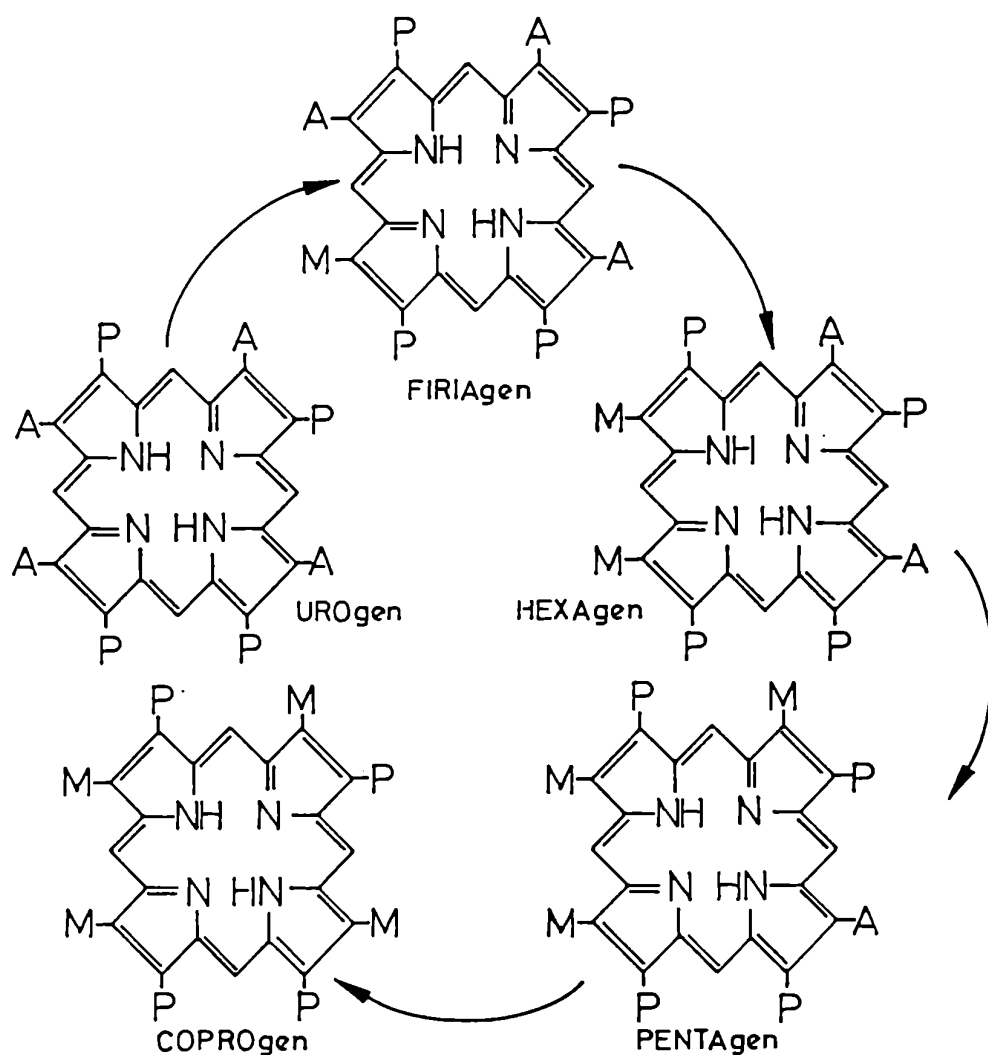


FIGURA I.5.: Decarboxilación de UROgen a COPROgen catalizada por URO-D.

A: Acetilo, M: metilo; P: propionilo

Durante la reacción se forma un intermediario tricarboxílico que desaparece a medida que aquella progresa. La decarboxilación de los residuos ácido propiónico es independiente y secuencial y debe comenzar en el carbono β de la cadena lateral, con la

pérdida estereoespecífica de uno de los átomos de hidrógeno (Zaman y col., 1972). En el esquema propuesto (Batlle y Rimington, 1965; Tait, 1968), las cadenas de ácido propiónico son convertidas en ácido β -hidroxipropiónico. La deshidratación de estos residuos produce ácido acrílico, probablemente el isómero *cis*, y su de carboxilación conduce a la formación de los grupos vinilo. Esta proposición está apoyada por el trabajo realizado con CPGasa de hígado de rata (Batlle y col., 1965) y por el uso de 2,4-bis(β -hidroxipropiónico)deuteroporfirinógenos como sustratos de la enzima (Sano, 1966). Más recientemente se demostró que la conversión enzimática de las cadenas laterales ácido propiónico del COPROgen a vinilo ocurre en forma secuencial a partir de las posiciones 2 a 4, a través de la formación de un porfirinógeno β -hidroxipropionato intermediario; estos hallazgos apoyan el esquema propuesto en la Figura I.6. (Yoshinaga y Sano, 1980).

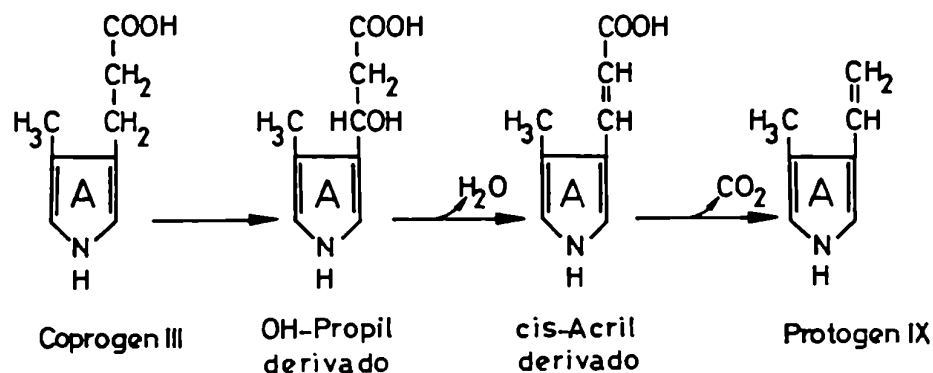


FIGURA I.6.: Decarboxilación de COPROgen a PROTOgen catalizada por CPGasa

I.3.6. Protoporfirinogenasa

El anteúltimo paso en la biosíntesis del hemo es la oxidación enzimática del PROTOgen IX a PROTO IX por la enzima mitocondrial PPGasa. Esta enzima ha sido identificada en numerosas

fuentes (Poulson y Polglase, 1975; Poulson, 1976; Jackson y col., 1978; Brenner y Bloomer, 1980). La actividad es oxígeno-dependiente pero, en *Escherichia coli*, fumarato y nitrato pueden reemplazar al oxígeno en la oxidación del sustrato bajo condiciones anaeróbicas (Jacobs y Jacobs, 1975, 1976).

La enzima de hígado de rata tiene un peso molecular de 35.000 daltons (Poulson, 1976) mientras que en levadura el peso molecular es de 180.000 daltons (Poulson y Polglase, 1975). Tiene una alta especificidad de sustrato y los agentes tiólicos reductores estimulan la actividad de la enzima; no requiere cofactores y los quelantes no tienen efecto sobre la PPGasa. Su mecanismo de acción no ha sido elucidado, sin embargo se ha postulado que los grupos sulfhidrilos del sitio activo serían importantes para la unión del sustrato a través de los residuos vinilo (Jackson y Games, 1975). También se ha demostrado que la reacción es estereoespecífica y tiene lugar a partir de un único punto en el anillo de la porfirina (Jackson y col., 1974).

I.3.7. Ferroquelatasa

Finalmente, el último paso de esta ruta de síntesis es la inserción de un hierro ferroso en la PROTO IX, reacción catalizada por la Fe-Quel (Rimington, 1958). Aunque la reacción puede ocurrir en ausencia de la enzima, se ha demostrado esta actividad enzimática en numerosas fuentes (Porra y Jones, 1963 a, Lascelles, 1964; Labbe y col., 1968; Jones y Jones, 1969).

La Fe-Quel es una enzima mitocondrial firmemente unida a la membrana interna de la mitocondria (Mc Kay y col., 1969). Es específica para hierro (II), pero pueden actuar como sustrato varias porfirinas dicarboxílicas además de PROTO IX, como meso y deuteroporfirina, aunque no sus porfirinógenos. Es una enzima lipoproteica; GSH, cisteína y 2-mercaptoetanol aumentan su actividad, mientras que el oxígeno es un potente inhibidor. Los lípidos son esenciales para la actividad de la enzima, su rol exacto no

se conoce pero se cree que podrían activarla alterando su conformación por unión con un ión metálico, para transferirlo de un medio acuoso a uno no acuoso, o por aumento de la solubilidad de la PROTO IX, facilitando su transporte a una zona lipofílica (Sawada y col., 1969; Yoneyama y col., 1969). La acción de los reactivos sulfhidrúlicos sobre la Fe-Quel no sólo protege los grupos sulfhidrilos de la proteína, sino que también contribuye al mantenimiento del hierro en el estado reducido (Porra y Jones, 1963 a, b) y, potencialmente, protege a la enzima y al sustrato frente a la posible peroxidación lipídica (Peterson y col., 1980).

Se ha demostrado que la administración de ciertas drogas con cadenas laterales insaturadas produce la acumulación hepática de pigmentos, algunos de los cuales inhiben la actividad de la Fe-Quel (De Matteis y Gibbs, 1975; De Matteis y col., 1980 a). Estos pigmentos son porfirinas modificadas, con un sustituyente a-normal en uno de los nitrógenos pirrólicos. La naturaleza y tamaño de estos sustituyentes sería responsable del diferente comportamiento de estos pigmentos. Así, la presencia de un sustituyente pequeño interferiría con la incorporación de metales divalentes, impidiendo que la porfirina modificada actúe como sustrato de la Fe-Quel; en tanto que, su interacción con el centro activo daría como resultado la inhibición de la enzima (De Matteis y col., 1980 a). Cuando el sustituyente es muy grande, como en el caso de los pigmentos no inhibitorios, por un impedimento estérico la porfirina modificada no podría unirse a la enzima y en consecuencia no habría alteración de su actividad (De Matteis y col., 1980 b). Una de las drogas que inducen la formación de los pigmentos inhibitorios es la griseofulvina, antimitótico usado habitualmente para obtener un modelo de porfiria experimental en ratones. Se encontró que, cualquiera sea la vía de administración de griseofulvina, se produce inhibición de Fe-Quel tanto en hígado como en piel, y se han propuesto mecanismos probables que explican la formación de porfirinas modificadas inducida por esta droga (Afonso y col., 1987; Vázquez y col., 1987 a).

I.4. BIODEGRADACION DEL HEMO

La bilirrubina es un pigmento anaranjado derivado de la degradación de hemoproteínas, particularmente de la hemoglobina de eritrocitos maduros (Figura I.7.). Las hemoproteínas deben sufrir primero la separación del hemo por enzimas proteolíticas, para que éste pueda ser metabolizado; luego, el anillo tetrapirrólico es selectivamente clivado en el puente metínico α . El primer paso degradativo requiere un ataque electrofílico, hierro (II), un agente reductor como el NADPH y oxígeno, para formar α -oxihemo. La hemooxigenasa microsomal (HOM) cataliza la oxidación del carbono del puente α (Tenhunen y col., 1969).

La actividad de la enzima es mayor en aquellos órganos cuya función es secuestrar eritrocitos envejecidos, y está aumentada en estados hemolíticos (Tenhunen y col., 1970 a). La HOM parece ser la enzima limitante de la velocidad de conversión del hemo en bilirrubina. Se ha sugerido que el hemo se combina con la apoenzima microsomal para formar la holoenzima; el oxígeno unido al complejo hemo-apoproteína sufre una activación reductiva en presencia de NADPH y puede reaccionar con el carbono α del hemo (Wolkoff y col., 1983).

El segundo paso en la apertura del anillo tetrapirrólico involucra una autooxidación por oxígeno molecular, y probablemente ocurre no enzimáticamente (Jackson y Kenner, 1968). Los carbonos en las posiciones angulares del anillo porfirínico vecinos al puente α son oxidados, se eliminan monóxido de carbono y hierro y se abre el anillo dando como resultado la formación del pigmento verde biliverdina (Frydman y col., 1981; Yoshinaga y col., 1982).

En mamíferos y peces, que excretan bilirrubina, la biliverdina es convertida en bilirrubina por una enzima soluble, biliverdina reductasa, que requiere NADH o NADPH para su actividad (Tenhunen y col., 1970 b).

Aunque la bilirrubina IX α es el isómero más abundante

en la naturaleza, se han detectado pequeñas cantidades de otros isómeros en bilis de humanos y animales (Blankaert y col., 1976; Blumenthal y col., 1977; Heirwegh y col., 1977).

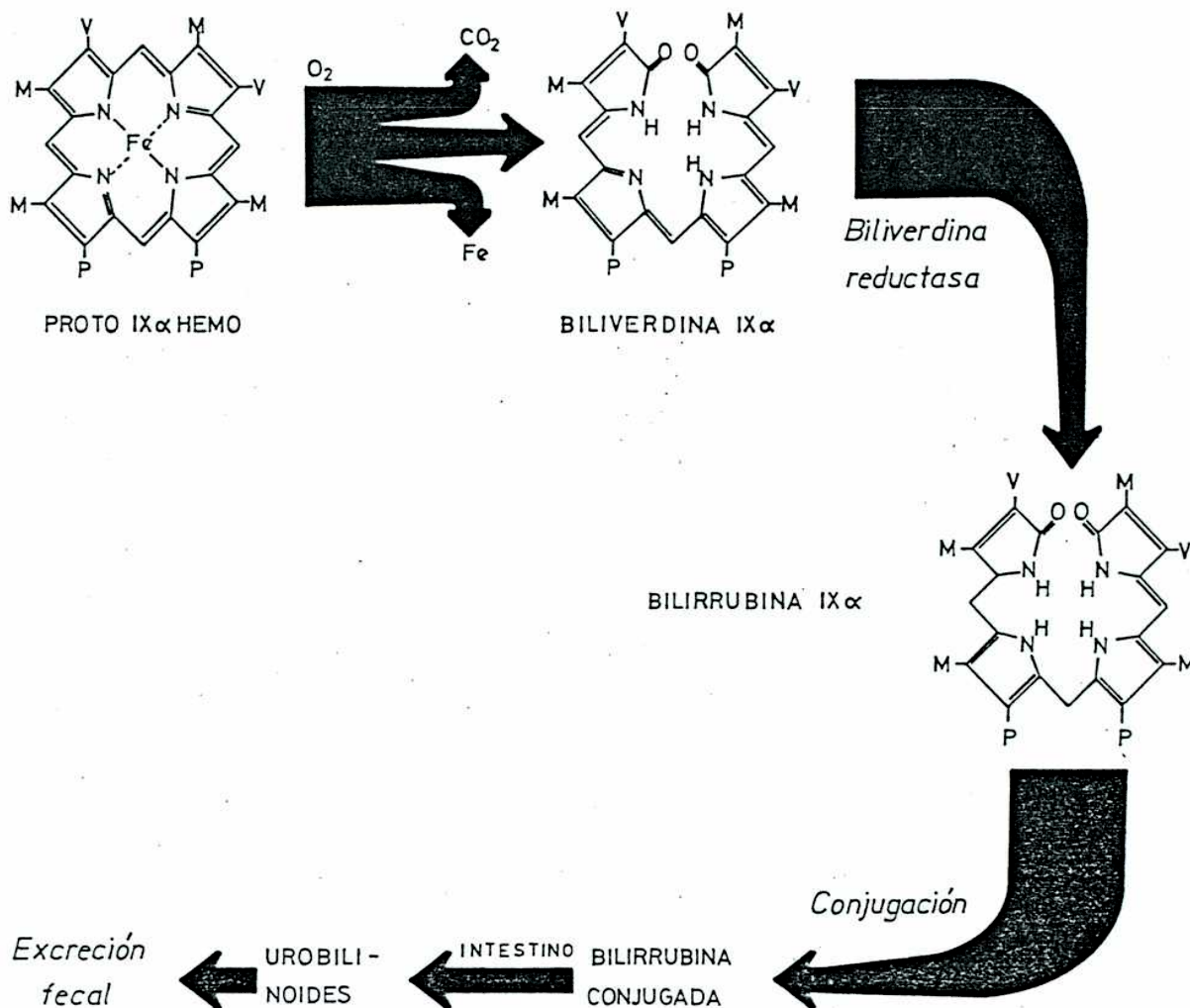


FIGURA I.7.: Catabolismo del hemo.
M: Metilo, P: propionilo, V: vinilo

Como consecuencia de la formación de este compuesto tóxico e insoluble, es necesario que el organismo conjugue la bilirrubina con ácido glucurónico para hacerla más soluble y facilitar

su excreción. La bilirrubina se une a proteínas plasmáticas transportadoras y es rápidamente extraída de la circulación por el hígado. Bajo condiciones fisiológicas normales, la eliminación de este pigmento del plasma parece ser una función específicamente hepática (Scharschmidt y col., 1975). En el hígado se conjugan una o las dos cadenas laterales de ácido propiónico de la bilirrubina, formándose mono y diconjugados respectivamente. Estudios realizados en conductos biliares y bilis de humanos (Blankaert y col., 1978), mamíferos (Compernelle y col., 1971; Cornelius y col., 1975) y aves (Cornelius y col., 1975) demostraron la formación de xilosil y glucosil conjugados. Aunque el ácido glucurónico es el principal grupo conjugante en bilis de mamíferos (Gordon y col., 1976), también se puede encontrar bilirrubina conjugada con azúcares complejos como glucuronosil-glucosil, glucuronosil-glucuronosil y glucosil-glucosil-glucuronosil (Kuenzle, 1970).

La bilirrubina conjugada alcanza el tracto intestinal y es degradada por bacterias intestinales a una serie de urobilinógenos y compuestos relacionados (Moscowitz y col., 1970; O'Carra, 1975) que serán finalmente excretados en las heces.

I.5. CONTROL DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO

En contraste con la gran importancia biológica del hemo, no se conoce otro papel fisiológico para las porfirinas libres y sus precursores, ALA y PBG, que el de ser productos intermedios en este camino biosintético. En condiciones normales, la cantidad de estos compuestos que se acumulan o excretan es muy pequeña, lo que indica que la biosíntesis del hemo se lleva a cabo con un alto grado de eficiencia. Se ha calculado que de todo el ALA sintetizado en el hígado, 65 % se emplea para producir citocromo P₄₅₀, 15 % para catalasa, 6 % para citocromos microsomales y 8 % para citocromo b₅ (Moore y Disler, 1985). Aproximadamente el 15 % del hemo sintetizado diariamente proviene de las células hepáticas,

es decir que se requieren 54 mg de ALA para la síntesis hepática de hemo, mientras que la médula ósea utiliza 304 mg de ALA para la síntesis de hemoglobina.

La conversión enzimática de PBG en porfirinas favorece la formación de los isómeros fisiológicos de la serie III con una eficiencia del 99,9 %. De la producción diaria de hemoglobina se excreta como precursores y porfirinas menos del 5 % (Batlle y col., 1981). Este notable rendimiento es el resultado de la existencia de una serie de controles estrechamente ligados. Sin embargo, si estos controles fallaran o fueran defectuosos, como ocurre en las porfirias, puede tener lugar la síntesis y/o acumulación de cantidades elevadas de intermediarios, con serias consecuencias para el organismo.

La alta concentración de precursores y/o intermediarios que puede alcanzarse cuando fallan los mecanismos de regulación, demuestra la gran capacidad potencial de trabajo de las enzimas del camino del hemo cuando pueden funcionar libremente.

I.5.1. Rol del ALA-S y su control por hemo

El punto de control primario del camino biosintético del hemo se encuentra a nivel de la enzima inicial, ALA-S. Hay un control por "feed-back" o retroinhibición sobre esta enzima y una regulación de su síntesis a nivel de transcripción y traducción, ejercidos por el producto final.

La capacidad de esta enzima para controlar la velocidad de la vía metabólica se debe, además, a su baja actividad endógena y a su corta vida media (Bishop y Desnick, 1982). Se demostró que cuando se hacen crecer *Rp. spheroides* en un medio deficiente en hierro, se acumulan grandes cantidades de COPRO, y que el agregado de pequeñas cantidades del metal corrige el problema (Lascelles, 1964). Por lo tanto, se postuló que el hierro actúa promoviendo la síntesis del producto final de la ruta metabólica,

el hemo, el cual a su vez inhibe la actividad de la primera enzima de la secuencia (Figura I.8.). La hipótesis se confirmó cuando se encontró que pequeñas cantidades de hemo o hemina eran capaces de provocar una marcada y específica inhibición del ALA-S, no sólo en bacterias sino también en otros tejidos (Sassa y Granick, 1970; Tyrell y Marks, 1972; Whiting, 1976).

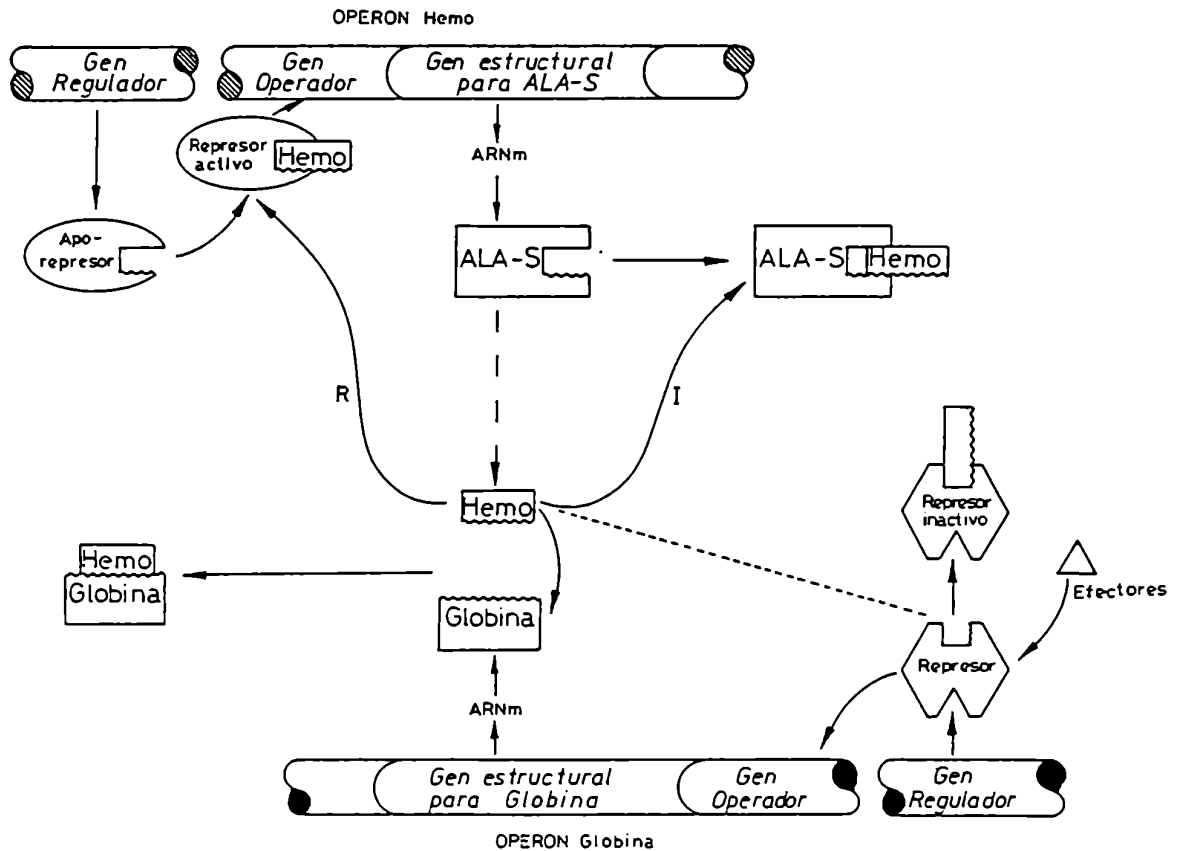


FIGURA I.8.: Mecanismo de regulación de la biosíntesis del hemo. I: Inhibición del ALA-S por producto final, R: represión de la síntesis de ALA-S.

Además de la inhibición por producto final, un control genético de la síntesis, dependiente de ADN, regula el nivel

celular de la enzima. El mecanismo postulado para explicar la síntesis de ALA-S y su control se basa en la conocida hipótesis de Jacob-Monod (Jacob y Monod, 1961; Tyrell y Marks, 1972; Whiting, 1976) (Figura I.8.).

El ALA-S tiene la capacidad de responder rápidamente a un aumento en el requerimiento de hemo, y su síntesis es reprimida a concentraciones de hemo de 10^{-7} M, mientras que la inhibición de la actividad de la enzima se produce a concentraciones de 10^{-5} M (Wolfson y col., 1979). Estos datos sugieren que el control del ALA-S ejercido por el hemo es más importante a nivel de la síntesis *de novo*, aunque debe tenerse también en cuenta la retroinhibición por producto final, ya que el hemo se sintetiza en la mitocondria, el mismo compartimiento en el que desarrolla su actividad catalítica el ALA-S (Wolfson y col., 1979; Kappas y col., 1983).

La administración exógena de hemo reduce la actividad de ALA-S disminuyendo la velocidad de transferencia de la enzima citosólica a la mitocondria (Hayashi y col., 1983; Srivastava y col., 1983). El rol que juega el hemo en estas circunstancias puede explicarse aceptando la existencia de un pool de hemo libre formado por hemo recién sintetizado, o proveniente de fuentes exógenas, no unido a proteínas. Este pool debe ser pequeño y con gran velocidad de recambio, como corresponde a una sustancia reguladora (Figura I.9.).

La utilización del hemo para la síntesis de distintas hemoproteínas debe estar muy bien coordinada con la formación de sus componentes proteicos específicos. El monómero de hemoglobina contiene hemo y globina en relación 1:1. Estudios realizados sobre la síntesis de estos componentes en reticulocitos y médula ósea de conejo han demostrado que un exceso de hemo no sólo inhibe su propia síntesis por los mecanismos ya descritos sino que, además, estimula la síntesis de globina (Marks y col., 1988) (Figura I.8.).

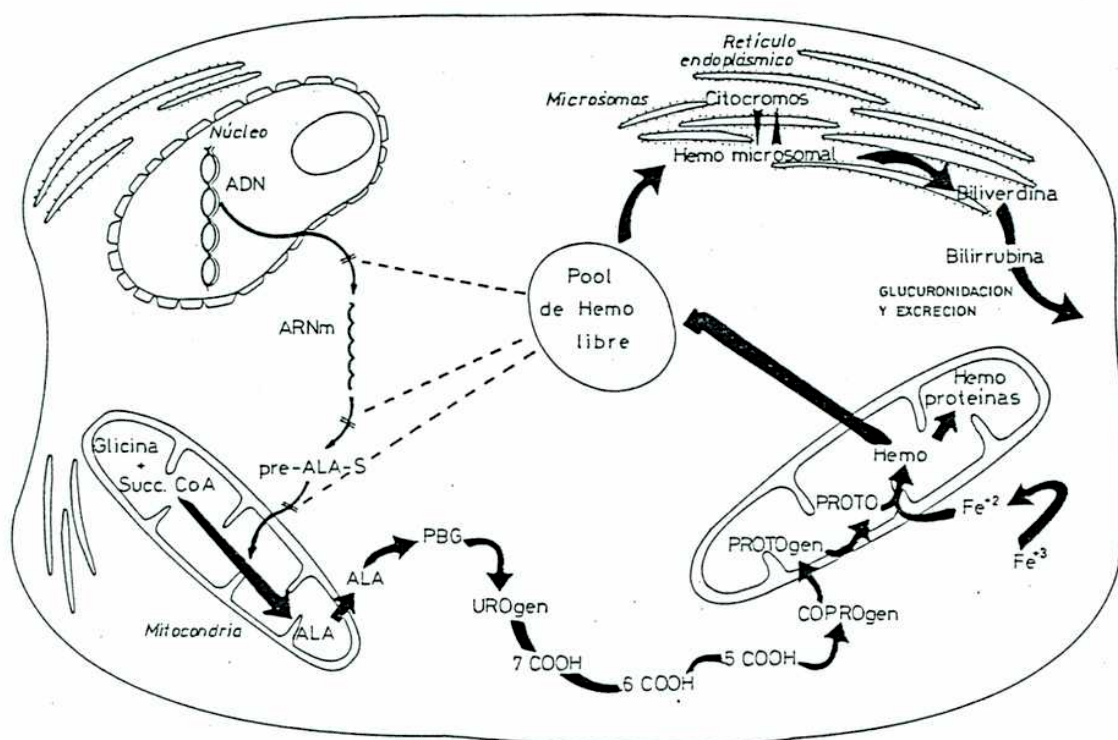


FIGURA I.9.: Pool de hemo regulatorio.

I.5.2. Control por localización tisular y subcelular

Los niveles de hemoproteínas varían considerablemente en los distintos tejidos, y hay evidencias de que las células de cada tejido son capaces de sintetizar sus propias hemoproteínas según sus necesidades (citado por Batlle y col., 1981). Parece existir una precisa correlación entre los niveles de las enzimas del camino del hemo y la correspondiente capacidad para sintetizar sus hemoproteínas. Así, por ejemplo, la actividad de ALA-D en conejo es elevada en hígado, relativamente alta en médula ósea y riñón y muy baja en otros tejidos (citado por Batlle y col., 1981). Esto sugiere que, por lo menos en parte, la concentración de las

enzimas en los distintos tejidos regula la cantidad de porfirinas sintetizadas en cada uno de ellos, lo cual depende, a su vez, de sus necesidades de hemo.

Llama la atención que ciertas etapas de la biosíntesis del hemo tengan lugar dentro de la mitocondria, mientras que otras ocurren en el citoplasma (Figura I.4.). Por esta razón, los metabolitos necesariamente deben difundir de un espacio al otro, y esto podría constituir de por sí un mecanismo regulatorio, especialmente si alguno de estos sustratos se encontrara unido a proteínas, con lo que su difusión podría modificarse según el estado de la célula (Batlle y col., 1981).

I.5.3. Control por interconexión con otros caminos metabólicos

La concentración estacionaria de ALA dentro de la mitocondria juega un papel relevante en la regulación de la biosíntesis de hemo, pues ha de determinar la cantidad de ALA que se transporte al citoplasma y que esté disponible para la síntesis de tetrapirroles. A su vez, la concentración estacionaria de ALA intramitocondrial estará gobernada por los niveles de glicina y de succinil-CoA generado en el ciclo de Krebs (Batlle y col., 1981). El ALA-S tiene una afinidad notablemente baja por la glicina, con valores de K_m entre 5 y 20 mM, y se ha demostrado que la concentración hepática de este aminoácido está muy por debajo de estos valores (Cowtan y col., 1973). Aparentemente, la insuficiente concentración de glicina para el ALA-S se debería, en parte, a la alta actividad de glicina-aciltransferasa, sistema clivante de glicina en la mitocondria hepática (Kikuchi, 1973). Esto sugeriría que otra forma de controlar la vía metabólica del hemo podría ser a través de la disponibilidad de uno de los sustratos iniciales (Piper y col., 1973; Neuberger, 1980).

Hay también evidencias sobre la importancia de la concentración intracelular de ATP en el control de la biosíntesis de porfirinas, aunque se han postulado efectos diversos. Se demostró

que el agregado de ATP al medio de crecimiento de *Rp. spheroides* inhibe significativamente la síntesis de tetrapirroles, y que en animales de laboratorio con porfiria inducida por ciertos agentes porfirinogénicos, los niveles de ATP estaban disminuídos, pero el agregado de ATP, ADP o AMP corregía la porfiria (Gajdos y Gajdos-Török, 1969). Se propuso entonces que el efecto del ATP se localiza a nivel del ALA-S mitocondrial, a través de la formación inducida por el ATP de un inhibidor de naturaleza proteica. Sin embargo, otros investigadores observaron que el ATP estimula significativamente la actividad del ALA-S citoplasmática en hígado de rata (Ohashi y Sinohara, 1978) y postularon que el ATP se uniría a un sitio alostérico de la enzima provocando cambios conformacionales positivos en los sitios de unión de los sustratos glicina y succinil CoA, que llevarían a una estimulación de la actividad de ALA-S. De estas evidencias se desprende que el ATP, análogamente a los efectos del hemo, desempeñaría un papel regulatorio dual, actuando directa o indirectamente sobre la actividad de ALA-S.

Existe un mecanismo adicional de regulación de la biosíntesis de porfirinas demostrado para *Rp. spheroides* según el cual la actividad de ALA-S estaría controlada por la presencia de un compuesto de bajo peso molecular, una cisteína trisulfuro capaz de convertir una forma inactiva de la enzima en una forma de alta actividad, de acuerdo a las necesidades de la célula (Wider de Xifra y col., 1976). La formación de este activador está catalizada por la cistationasa y su degradación está catalizada por la rodenasa; por lo que se postula que el contenido intracelular de cistina trisulfuro, y por lo tanto la variación de la actividad de ALA-S, estarían a su vez regulados por las actividades relativas de cistationasa y rodenasa, enzimas involucradas en el metabolismo de los compuestos azufrados. En callos de soya parece operar un mecanismo de control similar (Vázquez y col., 1980). En *Rp. palustris*, la actividad de ALA-S estaría controlada también por la presencia de un compuesto de bajo peso molecular, aunque el mecanismo de acción de este factor sería diferente al existente en

Rp. spheroides y en callos de soya (Viale y col., 1980). También en eritrocitos humanos provenientes de pacientes con distintos tipos de porfirias se ha demostrado que existe una correlación entre los niveles de actividad de la rodenasa y el ALA-S (Vázquez y col., 1987 b).

CAPITULO II

PORFIRIAS

	Página
II.1. Clasificación de las porfirias	29
II.2. Porfirias agudas	29
II.2.1. Porfiria aguda intermitente	31
II.2.2. Nueva porfiria aguda	31
II.3. Porfirias cutáneas	33
II.3.1. Pofiria eritropoyética congénita	33
II.3.2. Coproporfiria eritropoyética	34
II.3.3. Protoporfiria eritropoyética	34
II.3.4. Porfiria cutanea tarda	35
II.4. Porfirias mixtas	37
II.4.1. Coproporfiria hereditaria	37
II.4.2. Porfiria variegata	38

II. PORFIRIAS

II.1. CLASIFICACION DE LAS PORFIRIAS

Las porfirias son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por un exceso de producción de porfirinas y/o sus precursores, como consecuencia de alteraciones específicas en el camino biosintético del hemo.

Tradicionalmente se clasificó a las porfirias en hepáticas y eritropoyéticas (Tabla II.1.), considerando que los tejidos en los que se expresaban fundamentalmente las alteraciones metabólicas eran el hígado y la médula ósea (Schmid y col., 1954). Frecuentemente se encuentran porfirias que, de acuerdo a sus manifestaciones clínicas y bioquímicas, no pueden ubicarse estrictamente en uno de estos grupos, o bien hay casos de compromiso variado de ambos tejidos. Por lo tanto, posteriormente se incluyeron dentro de la clasificación anterior la porfiria hepatoeritropoyética y las porfirinurias (Batlle y col., 1981) (Tabla II.1.). Debido a la gran variedad de manifestaciones clínicas y bioquímicas de las porfirias, se las clasifica actualmente, de acuerdo a la sintomatología, en agudas, cutáneas y mixtas (Moore y Disler, 1985) (Tabla II.1.).

II.2. PORFIRIAS AGUDAS

Las porfirias agudas son hereditarias, transmitidas con un carácter mendeliano autosómico dominante y proclives a presentar ataques agudos provocados por diversos factores, especialmente por drogas. También puede desencadenarse la crisis aguda por cambios en el balance de esteroides, como sucede durante el período menstrual y el embarazo. En estas enfermedades se distinguen

tres etapas:

- a) Latencia
- b) Ataque agudo
- c) Remisión

TABLA II.1.: Clasificación de las porfirias

<u>Según su origen</u>	<u>Según sintomatología</u>
ERITROPOYETICAS	Porfiria eritropoyética congénita (Günther)
	Protoporfiria eritropoyética (PPE)
	Coproporfiria eritropoyética (CPE)
HEPATICAS	Porfiria cutánea tarda (PCT)
	Porfiria variegata (PV)
	Coproporfiria hereditaria (CPH)
	Nueva porfiria aguda (NPA)
	Porfiria aguda intermitente (PAI)

En la primera etapa, el metabolismo de las porfirinas se encuentra bioquímicamente compensado, aunque puede excretarse una cantidad elevada de precursores de porfirinas.

Durante el ataque agudo, la enfermedad se presenta con dolores en los miembros y en la región abdominal, perturbaciones neurosiquiátricas y disfunción del sistema nervioso autónomo (Beattie y Goldberg, 1976).

Cuando cede la fase aguda de la enfermedad, en la remisión, no hay sintomatología clínica pero se mantiene elevada la excreción de precursores (Batlle y col., 1981).

II.2.1. Porfiria aguda intermitente

Se demostró que en la porfiria aguda intermitente (PAI) el defecto enzimático se encuentra a nivel de la deaminasa (Tabla II.2.), y que la actividad de esta enzima está disminuída en eritrocitos, en cultivos de fibroblastos de piel y en otros tejidos de pacientes con PAI (Strand y col., 1972; Sassa y col., 1975; Batlle y Rossetti, 1977). Los casos latentes pueden detectarse dosando la actividad de deaminasa en eritrocitos (Magnussen y col., 1974; Mustajoki, 1976); se han encontrado así pacientes que nunca han sufrido ataques agudos de esta enfermedad. En todos los estudios realizados, se ha determinado que en la PAI la actividad de ALA-S estaba aumentada (Brodie y col., 1977 a; Moore y col., 1980 b).

La PAI se manifiesta con mayor incidencia en las mujeres y con una prevalencia dentro de la tercera década de vida (Goldberg y Moore, 1980), lo cual asignaría a las hormonas un importante papel en la manifestación de la enfermedad. Hay pocos casos descritos en niños (Barclay, 1974) y no es común que un primer ataque ocurra en adultos mayores de 50 años.

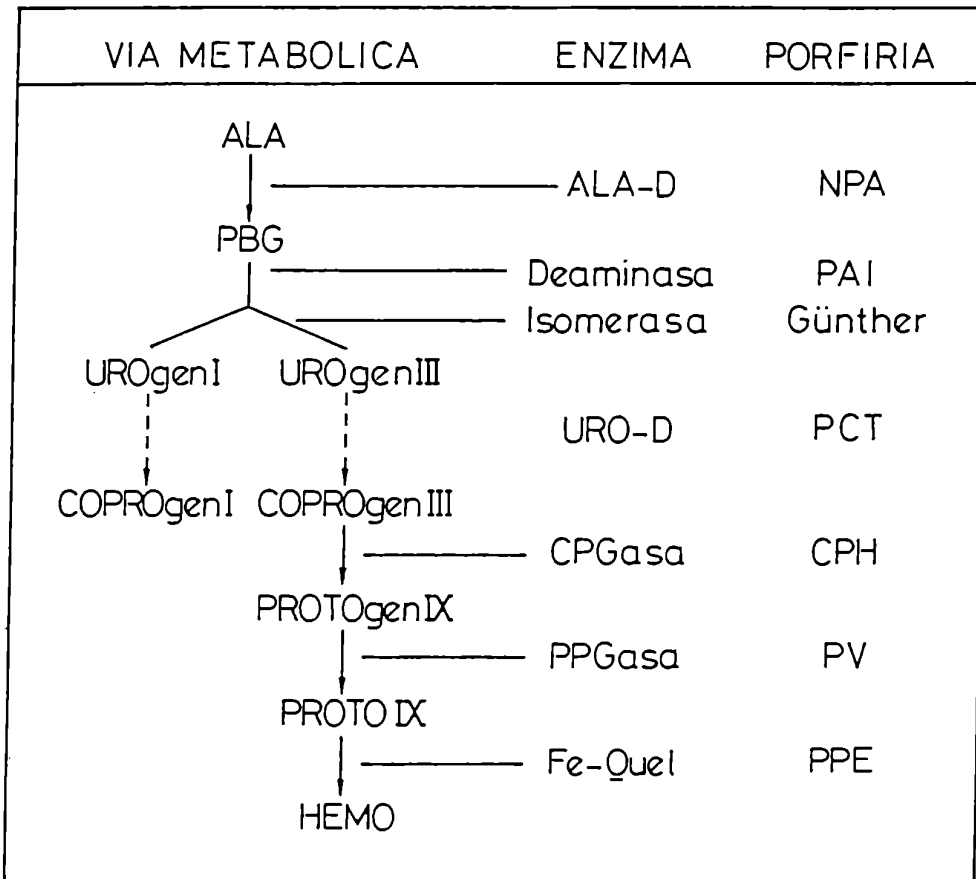
Esta porfiria se caracteriza clínicamente por un amplio espectro de manifestaciones neurológicas y siquiátricas sin producción de lesiones dérmicas.

II.2.2. Nueva porfiria aguda

La nueva porfiria aguda (NPA) fue descrita por primera vez en 1979 (Doss y col., 1979). Se caracteriza por una excreción urinaria aumentada de ALA y, clínicamente, por los típicos episodios de trastornos neurológicos. La actividad de ALA-D eritrocitaria está significativamente disminuída (Tabla II.2.), pudiendo llegar al 3-4 % de los valores observados en sujetos normales. Se ha sugerido que la actividad deficiente de ALA-D en estos pacientes se debe a pequeñas alteraciones en la estructura primaria de

la proteína (Brandt y Doss, 1981).

TABLA II.2.: Deficiencia enzimática responsable de cada tipo de porfiria



Si bien los pacientes presentan una actividad enzimática de alrededor del 3 % del valor normal en eritrocitos y médula ósea (Doss y col., 1983), sus padres tienen un 50 % de la actividad de sujetos normales. Esto sugiere que los enfermos son homocigota y que el gen se hereda en forma autosómica recesiva (Doss y col., 1982).

II.3. PORFIRIAS CUTANEAS

II.3.1. Porfiria eritropoyética congénita

Esta es la más sorprendente de las porfirias en cuanto a la severidad de la fotosensibilización cutánea. También es la más rara, ya que sólo se han reportado menos de 100 casos (Meyer y Schmid, 1983). Se la conoce también como porfiria congénita, porfiria eritropoyética o enfermedad de Günther, y se hereda con carácter autosómico recesivo. En los pacientes homocigota se observa un marcado incremento de porfirinas en médula ósea, glóbulos rojos, orina y heces. Las porfirinas excretadas son predominantemente del tipo isomérico I y los estudios *in vitro* realizados en eritrocitos y fibroblastos de piel de estos pacientes indican que la lesión metabólica se debe a una deficiencia en la actividad de isomerasa (Romeo y Levin, 1970 a, b) (Tabla II.2.). Los enfermos heterocigota tienen una actividad de isomerasa intermedia entre la de los homocigota y los sujetos normales. También se han descrito casos en los cuales la falla enzimática consistió en un aumento de la actividad de la deaminasa (Watson y col., 1964) y tanto en animales como en humanos se ha observado que el cuadro bioquímico característico de la porfiria eritropoyética congénita era debido a una deficiencia de isomerasa, conjuntamente con un aumento relativo de deaminasa (Moore y col., 1978; With, 1980; Magnin y col., 1986).

La porfiria eritropoyética congénita se manifiesta generalmente en la infancia. Presenta severas lesiones fotocutáneas en áreas expuestas al sol. Se forman ampollas cuya ruptura y posterior infección conduce a la fotomutilación. Los dientes presentan fluorescencia roja a la luz UV debido al depósito de porfirinas en la dentina y, en la autopsia, todo el esqueleto exhibe esta fluorescencia (Batlle y col., 1981; Pimstone, 1985). Generalmente existen anemia y esplenomegalia moderadas, previas a la fotosensibilidad cutánea. No se han descrito síntomas neurológicos relacionados con drogas u hormonas en esta enfermedad.

II.3.2. Coproporfiría eritropoyética

Esta porfiria es la más rara de todas; se caracteriza por trastornos de fotosensibilización con aumento de COPRO III en eritrocitos. No hay anemia ni trastornos del hemo, y el aumento de COPRO III se debe a una deficiencia en la CPGasa (Tabla II.2.) que se transmitiría según un carácter autosómico dominante (Heilmeyer y Clotten, 1964; Topi y col., 1977).

Las manifestaciones de fotosensibilidad cutánea son leves, con prurito, edema y tumefacción de las zonas expuestas al sol; no deja cicatrices (Heilmeyer y Clotten, 1964; Batlle y col., 1981).

II.3.3. Protoporfiría eritropoyética

La protoporfiría eritropoyética (PPE) es una enfermedad con fotosensibilidad congénita asociada con la presencia de PROTO en los glóbulos rojos circulantes y en médula ósea, que fluorescen intensamente a la luz UV. Las reacciones agudas de fotosensibilidad ocurren en la niñez. La exposición al sol es seguida rápidamente por una sensación de picazón y ardor en las áreas expuestas, asociadas con intenso prurito, eritema, edema, formación de ampollas y exudación. La repetición de episodios fotocutáneos a lo largo de los años genera costras, ulceraciones y cicatrices en la piel, y puede llegar a la atrofia de pabellones auriculares y espesamiento céreo de nudillos y dedos (Batlle y col., 1981; Pimstone, 1985).

El patrón de sobreproducción de precursores del hemo es consistente con una deficiencia en la actividad de Fe-Que1 (Tabla II.2.) que está reducida en un 70-85 % con respecto a los valores normales en células eritroides, hígado y fibroblastos (Bottomley y col., 1975; Bloomer, 1976; Becker y col., 1977). Las observaciones de fluorescencia en normoblastos y glóbulos rojos, y la mejoría de los pacientes luego de transfusiones de sangre, sugieren

que el sitio primario de sobreproducción de porfirinas es la médula ósea (Lamola y col., 1975; Piomelli y col., 1975). Sin embargo, hay evidencias de que, en algunos individuos, el hígado también puede contribuir significativamente a la sobreproducción de porfirinas. Estas evidencias incluyen: 1) elevada excreción fecal de PROTO (Donaldson y col., 1967), 2) actividad aumentada de ALA-S en hígado (Cripps y Mac Eachern, 1971) y 3) la restricción calórica aumenta el contenido fecal y plasmático de PROTO sugiriendo un "efecto glucosa" mediado por el hígado (Schoenfeld, 1982; Pimstone, 1985).

II.3.4. Porfiria cutanea tarda

La porfiria cutanea tarda (PCT) es la forma más común de porfiria humana. Los efectos fotocutáneos reflejan una sobreproducción hepática de porfirinas debida a la actividad disminuida de URO-D (Kushner y col., 1975; Elder y col., 1978; Felsher y col., 1982) (Tabla II.2.). Las manifestaciones clínicas y bioquímicas raramente son espontáneas y casi invariablemente están asociadas con sobrecarga de hierro y daño hepático (Joubert y col., 1973; Kushner y col., 1975). Las lesiones cutáneas no son fotomutilantes, y pueden reducirse y hasta desaparecer disminuyendo el contenido hepático de hierro o eliminando los agentes desencadenantes de la enfermedad (Felsher y col., 1982; Wainstok de Calmanovici y col., 1986, 1987).

La manifestación bioquímica de la PCT incluye aumento de producción, acumulación en tejidos y excreción de porfirinas, principalmente URO.

La clásica PCT esporádica, la más común, está asociada con el abuso de alcohol y el daño hepático, y se presenta generalmente en la cuarta década de vida (Joubert y col., 1973), aunque se han descrito 50 casos de PCT infantil (Cruces Prado y col., 1980; Batlle y col., 1989).

En el 70 % de los casos reportados el hierro hepático juega un rol importante en la expresión clínica y bioquímica de la lesión metabólica (Kushner y col., 1975). La mayoría de los casos restantes son inducidos por estrógenos (Pimstone, 1985). Esta susceptibilidad para desarrollar la enfermedad se debe a una actividad disminuída de la URO-D hepática (Kushner y col., 1975; Elder y col., 1978; Afonso y col., 1985).

En contraste con la PCT esporádica, en la PCT familiar tanto la URO-D hepática como la eritrocitaria están reducidas a un 50 % de los valores control (Kushner y col., 1976; Elder y col., 1978; Afonso y col., 1985). El defecto enzimático se transmite como carácter autosómico dominante; los sujetos porfíricos latentes o subclínicos son heterocigota y son detectados por estudios familiares (Elder, 1980).

Los primeros casos de PCT tóxica endémica fueron descritos en el este de Turquía entre 1955 y 1961, donde varios miles de personas se intoxicaron con hexaclorobenceno (HCB) (Schmid 1960; Cam y Nigogosyan, 1963). Los estudios de algunos de estos enfermos mostraron que los síntomas de porfiria continuaban después de más de 25 años, aún cuando los niveles de HCB en sangre habían disminuído notablemente (Peters y col., 1982; Smith y col., 1985). El defecto porfirinogénico del HCB se confirmó administrando el fungicida a ratas y se observó disminución de la actividad hepática de URO-D asociada con disturbios bioquímicos similares a los de PCT humana (Ockner y Schmid, 1961; San Martín de Viale y col., 1970, 1976 a, b, 1977; Ríos de Molina y col., 1977). Se han descrito otros casos de PCT tóxicas endémicas en plantas industriales, entre ellas las producidas por 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD); 2,4-diclorofenol; 2,4,5-triclorofenol y otros hidrocarburos policlorados (Smith y col., 1985). En modelos experimentales realizados con ratas se comprobó que la excreción de porfirinas continuaba aumentada y la actividad hepática de URO-D seguía disminuída aún 14 meses después del tratamiento con HCB (Koss y col., 1983) y 12 semanas después del tratamiento con

TCDD (Smith y col., 1981), si bien la vida media de estos compuestos porfirinogénicos es mucho menor (Koshakji y col., 1984; Smith y col., 1985).

En todos los casos el síndrome cutáneo surge a consecuencia de la fotosensibilización, con aparición de ampollas en zonas expuestas que se abren, erosionan, ulceran, y dan lugar a costras; la piel de esas zonas se pigmenta. En los sitios con atrofia cicatrizal consecutivas a las ampollas pueden observarse áreas acrómicas y quistes epidérmicos. En algunos casos hay esclerodermia en cabeza, tórax y manos. Es habitual la hipertrichosis, constituida por pelos cortos y pigmentados, en orejas, región malar, cejas y frente. Estos cuadros son notorios en la época estival, y más aún cuando existe un factor desencadenante. Sin embargo, algunos pacientes no sufren empeoramiento durante el verano sino en otoño o aún en invierno, lo que indicaría que la acción solar no se manifiesta bruscamente sino que es acumulativa (Batlle y col., 1981).

II.4. PORFIRIAS MIXTAS

La porfiria variegata (PV) y la coproporfiria hereditaria (CPH) tienen muchas manifestaciones clínicas en común; pueden presentar fotosensibilidad cutánea, ataques agudos, o una combinación de ambos. Las lesiones cutáneas son idénticas, lo mismo que los ataques agudos, y también los reactivos o drogas que pueden desencadenar los ataques son los mismos, y los agentes conocidos como inductores hepáticos de citocromo P₄₅₀ o que incrementan el "turnover" de hemo, como barbitúricos, hidantoína y griseofulvina, son potencialmente peligrosos.

II.4.1. Coproporfiria hereditaria

Las manifestaciones clínicas de la CPH son muy similares a las de la PAI, aunque es una porfiria más moderada. Las lesiones

cutáneas son más frecuentes que en la PV y son indistinguibles de las observadas en PCT. Los casos latentes, con aumentada excreción urinaria y fecal de COPRO III, son muy comunes en familiares de pacientes con CPH; estos individuos nunca llegan a ser clínicamente manifiestos (Goldberg y col., 1967; Elder y col., 1976; Brodie y col., 1977 b).

Igual que en la PAI, esta porfiria es más frecuente en mujeres y los ataques agudos están asociados con el ciclo menstrual, embarazo o tratamiento con esteroides (Hunter y col., 1971; Paxton y col., 1975). La CPH es latente antes de la pubertad.

La actividad de CPGasa está disminuída en un 50 % del valor normal (Tabla II.2.) en fibroblastos (Elder y col., 1976), linfocitos (Grandchamp y Nordmann, 1977) e hígado (Hawk y col., 1978) y se encontró reducida al 2 % del valor normal en linfocitos en un caso homocigota (Grandchamp y col., 1977). No hay acumulación de porfirinas en hígado, la COPRO parece ser eficientemente transportada desde los hepatocitos hacia la bilis o el plasma (Haeger-Aronson y col., 1968).

II.4.2. Porfiria variegata

Igual que la CPH, la PV es una porfiria heredada con carácter autosómico dominante que puede presentar síntomas neurológicos y/o cutáneos. El defecto genético se encuentra a nivel de la PPGasa (Tabla II.2.). Se la conoce también como protocoproporfiria o porfiria genética sudafricana, ya que es particularmente común entre la población blanca de Sudáfrica.

Los síntomas neurológicos de la PV, igual que los de la CPH, frecuentemente son indistinguibles de los de la PAI. La fotosensibilidad de la piel se presenta en 2/3 de los pacientes con PV, y estas manifestaciones cutáneas son similares a las descritas para PCT, con aparición de vesículas, aumento de la pigmentación e hipertrichosis.

Bioquímicamente se caracteriza por un aumento en el contenido fecal de PROTO y COPRO III, y la presencia de una fracción denominada porfirina x, definida como una porfirina insoluble en éter/ácido acético, que es típica de esta porfiria y se encuentra en mayor proporción que las restantes porfirinas (Rimington y col., 1968; Elder y col., 1974). Durante los ataques agudos está también aumentada la excreción urinaria de ALA, PBG y COPRO III, además de la URO formada no enzimáticamente a partir del exceso de PBG. A diferencia de la PAI, en la remisión el contenido urinario de precursores es normal o sólo ligeramente aumentado. En el plasma de muchos pacientes con PV o CPH se ha encontrado un complejo porfirínico denominado Pu, formado por COPRO y una molécula no peptídica, tal vez un lípido, aunque su significado es desconocido (Day y col., 1978; Eales y col., 1980).

La actividad hepática de ALA-S está aumentada en pacientes con PV, principalmente durante los ataques agudos (Strand y col., 1970) por lo que es probable que el exceso de ALA y PBG en orina, igual que ocurre en PAI, se origine en el hígado. Las porfirinas hepáticas parecen no estar aumentadas, y se ha sugerido que el exceso fecal y urinario de porfirinas se origina en intestino y túbulos renales respectivamente (Day y col., 1980).

FOTODINAMICA Y PORFIRINAS

	Página
III.1. Fotoquímica y fotobiología	40
III.2. Patrones de fototoxicidad en las porfirias	44
III.3. Fotosensibilidad porfírica	45
III.4. Estudios <i>in vitro</i> de la sensibilización fotoquímica por porfirinas	48

III. FOTODINAMICA Y PORFIRINAS

III.1. FOTOQUIMICA Y FOTOBIOLOGIA

Se define la fotobiología como la ciencia que se ocupa de los efectos de la radiación no ionizante sobre los sistemas biológicos. Como todos los eventos fotobiológicos son el resultado de reacciones fotoquímicas que involucran moléculas biológicas, se desprende de esto que la fotosensibilidad cutánea implica eventos fotoquímicos que tienen lugar en la piel (Wan y col., 1981 a; Parrish y col., 1985).

Las moléculas biológicas tienden a absorber energía en las regiones UV y visible del espectro electromagnético. En general, moléculas que sólo contienen enlaces simples absorben en el UV lejano, mientras que sistemas moleculares con dobles enlaces conjugados absorben a mayores longitudes de onda, incluyendo la región visible. La estructura tetrapirrólica de las porfirinas es tá asociada con bandas de absorción en el espectro visible. La más intensa de éstas es la banda de Soret, cercana a los 400 nm. Existen cuatro picos de absorción adicionales, de menor intensidad, entre 500 y 650 nm para las porfirinas no queladas con metales.

La absorción de energía radiante por una molécula de porfirina causa su transformación en una molécula en estado excitado. A temperatura ambiente todas las moléculas están en su estado basal, es decir el nivel de menor energía. Sin embargo, tras la absorción de un fotón, o un cuanto de energía radiante, se producen cambios en la configuración electrónica basal de la molécula que conducen a distintos estados excitados de mayor energía. Si un electrón de un determinado par es promovido a un orbital de mayor energía sin variar la dirección original de su espín, se dice que la molécula está en un estado excitado singulete, mientras que si

el electrón invierte la dirección de su espín, la molécula estará en un estado excitado triplete.

Las moléculas en estado singulete son inestables y de vida media muy corta, tienen la capacidad de relajarse a estados más estables, de menor energía. En cambio, el estado triplete tiene vida media mucho más larga y su nivel de energía es menor que el del correspondiente estado singulete de la misma molécula. Ambos estados excitados tienden a pasar a configuraciones basales estables disipando la energía absorbida, ya sea por emisión de luz o calor, o transfiriendo la energía a otra molécula (Figura III.1.).

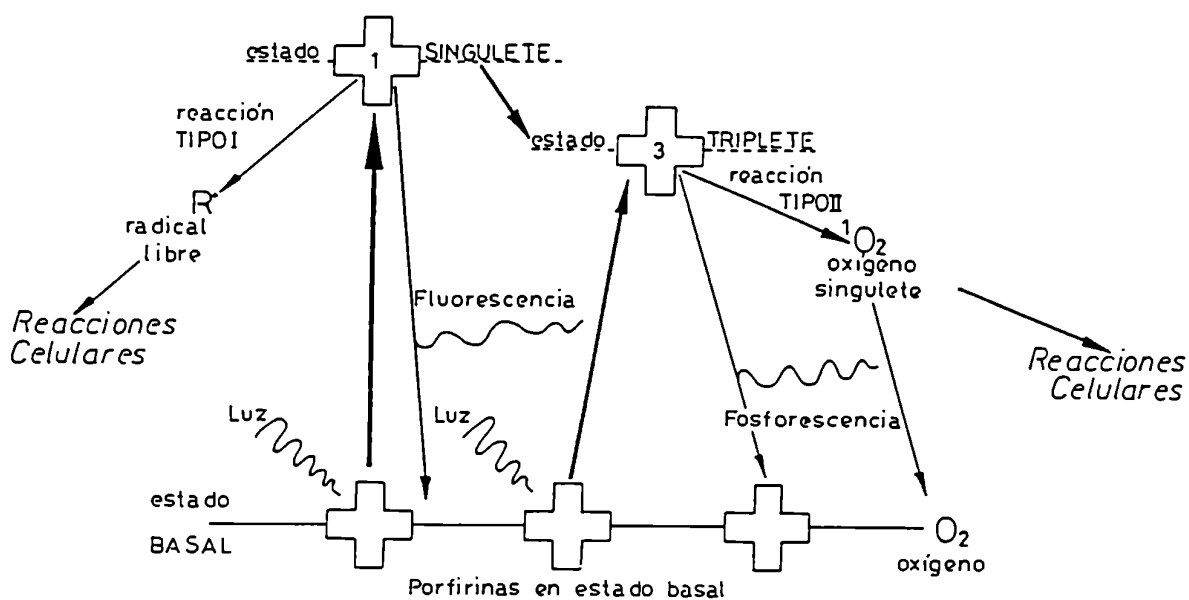


FIGURA III.1.: Transiciones energéticas de las porfirinas

Una molécula en estado excitado singulete podría transferir energía directamente a otras moléculas, pero esto es poco probable debido a su naturaleza altamente inestable y a su corta vida media, por lo que su energía se disipa rápidamente por emisión de calor

o fluorescencia. El estado triplete, de vida media mayor parece estar involucrado en la disipación de energía a través de reacciones fotoquímicas con otras moléculas, especialmente en sistemas biológicos.

Las reacciones fotoquímicas mediadas por porfirinas en la piel parecen ser ejemplos de procesos de transferencia de energía en los que las moléculas en estado excitado, singulete o triplete, generadas por absorción de energía lumínica, ceden una porción de la energía absorbida a otras moléculas aceptoras. Se considera que las moléculas aceptoras involucradas en estas reacciones en la piel incluyen oxígeno molecular y varios componentes de las biomoléculas complejas que forman la estructura cutánea. El mecanismo exacto por el cual las porfirinas en estado excitado sensibilizan a la piel *in vivo* sigue siendo una teoría. Sin embargo, hay muchas evidencias que sugieren que el oxígeno es un importante intermediario en la cadena de reacciones (Weishaupt y col., 1976; Suwa y col., 1978; Gibson y Hilf, 1985; Seret y col., 1986).

Las moléculas de porfirina en estado triplete poseen adecuadas cantidades de energía de excitación para actuar como donoras para las moléculas aceptoras de oxígeno en estado basal (Dalton y col., 1972; Spikes, 1975; Bodaness y Chan, 1977). Esta transferencia de energía resulta en el pasaje del oxígeno al estado excitado singulete. Esta es una especie de corta vida media pero altamente reactiva, y parece ser el agente oxidante activo en muchas reacciones fotooxidativas inducidas por porfirinas; *in vitro* es un poderoso agente oxidante de compuestos de importancia biológica como lípidos (Goldstein y Harber, 1972; Schothorst y van Steveninck, 1972), colesterol (Lamola y col., 1973; Suwa y col., 1977) y aminoácidos (Goldstein y Harber, 1972; Mauck y Girotti, 1973; Spikes, 1975; de Goeij y col., 1976), particularmente histidina, metionina, triptofano, cisteína y tirosina (Spikes y Mac Knight, 1970; Girotti, 1979; Sandberg y Romslo, 1981).

Los mecanismos dependientes de oxígeno inducidos por

porfirinas se encuentran implicados en la peroxidación de lípidos de membrana celular (Goldstein y Harber, 1972; Lamola y col., 1973; Bachowsky y col., 1988), "cross-linking" de proteínas de membrana plasmática e intracelulares (Dubbelman y col., 1978; Kohn y Kessel, 1979; van Steveninck y Dubbelman, 1984; Vincent y col., 1986 a; Aft y Mueller, 1985), inhibición de enzimas asociadas a membrana plasmática y mitocondrial (Sandberg y Romslo, 1981; Sandberg y col., 1981, 1982; Das y col., 1985), pérdida de la integridad y función de la membrana (Schothorst y col., 1970; Hsu y col., 1971; Girotti, 1976; Dubbelman y col., 1980 a), disrupción de organelas intracelulares (Gschnait y col., 1975 a; Moan y col., 1982) y muerte celular (Dougherty y col., 1975; Nilsson y col., 1975; Fritsch y col., 1976; Schothorst y col., 1977; Moan y col., 1987).

En los sistemas biomoleculares de la piel, la proximidad del oxígeno, porfirinas y apropiadas moléculas "target" parece ser suficiente como para posibilitar tales secuencias de transferencia de energía *in vivo*, con el resultado final del daño agudo o crónico de la integridad estructural y funcional de sus elementos vitales (Dubertret y col., 1982).

Las reacciones fotodinámicas inducidas por porfirinas también pueden efectuarse por mecanismos de transferencia de electrones o por formación de radicales libres, como el radical superóxido. Otros procesos alternativos pueden involucrar la transferencia de electrones entre la porfirina excitada y el sustrato, con participación del oxígeno para dar como resultado los productos de oxidación finales de la cadena de reacciones (Sconfienza y col., 1980; Rossi y col., 1981; van Steveninck y col., 1986).

Como todas las porfirinas fotoactivas que se acumulan en las distintas porfirias tienen la capacidad potencial de iniciar las reacciones fotooxidativas en la piel por los mismos mecanismos generales, surge naturalmente el interrogante de por qué pacientés con diferentes formas de porfiria no manifiestan lesiones cutáneas de morfología uniforme. Como se dijo antes, la probable

explicación de este fenómeno parece residir en las amplias diferencias en las propiedades físico-químicas de los distintos tipos de porfirinas que se acumulan en cada porfiria (Sandberg y col., 1982; Seret y col., 1986).

Los dos patrones generales de daño cutáneo observados en las porfirias son considerados como el resultado de la diseminación de las porfirinas, a través de la corriente sanguínea, desde sus tejidos de origen hasta la piel. Una hipótesis alternativa sostiene que las porfirinas acumuladas en el tejido cutáneo son sintetizadas *in situ* (Gschnait y col., 1975 a; Bickers y col., 1977; Afonso y col., 1987; Vázquez y col., 1987 a). La secuencia de eventos que conduce al daño cutáneo se inicia cuando las porfirinas allí acumuladas absorben energía lumínica.

III.2. PATRONES DE FOTOTOXICIDAD EN LAS PORFIRIAS

Excepto la PAI y la NPA, todas las porfirias incluyen alguna forma de fotosensibilidad cutánea como una de las principales manifestaciones entre sus síntomas clínicos asociados.

Se observan dos patrones generales de cambios anormales en la piel, atribuibles a las interacciones de las porfirinas y la luz dentro de ese tejido. Para cada uno de los desórdenes en el metabolismo de las porfirinas que exhiben fotosensibilidad se considera más característico uno u otro patrón, aunque existen casos de combinación de estos cambios anormales en la piel de un mismo paciente o de pacientes distintos con el mismo tipo de porfiria. El primer patrón de reacción es doloroso y con una rápida respuesta fototóxica. El segundo se desarrolla lentamente, sin dolor, y puede ser mucho más destructivo, presentando ampollas, escaras y erosiones (Poh-Fitzpatrick, 1985).

Si la fotosensibilidad cutánea es una manifestación de algunos de los diferentes síndromes porfíricos, las diferencias en los tipos de lesiones de la piel mostradas por los pacientes

con distintas formas de porfiria son aparentemente determinadas por las propiedades físico-químicas de las diferentes porfirinas y/o precursores que se acumulan en cada enfermedad. A su vez, las propiedades físicas y químicas de los intermediarios de la biosíntesis del hemo están determinadas por sus estructuras moleculares (Sandberg y Romslo, 1981; Sandberg y col., 1982; Lim y col., 1987).

La PAI y la NPA son las únicas porfirias en las que los principales precursores acumulados no son moléculas fotoactivas. En todos los demás síndromes porfíricos, los defectos enzimáticos específicos conducen a la acumulación de grandes cantidades de tetrapirroles oxidados. Todas las porfirinas oxidadas son fotoactivas, poseen la propiedad de interactuar con la energía lumínica de varias formas específicas. El sistema de dobles enlaces conjugados en los cuatro anillos pirrólicos y los puentes metino que forman la estructura central de estas moléculas proveen la estructura geométrica y electrónica necesaria para que estos compuestos sean capaces de absorber energía de la luz. La absorción de energía radiante de apropiada longitud de onda inicia la cadena de eventos que desemboca en los signos y síntomas de la fotosensibilidad cutánea (Poh-Fitzpatrick, 1985).

III.3. FOTOSENSIBILIDAD PORFIRICA

Las longitudes de onda de la luz preferencialmente absorbidas por las porfirinas son capaces de penetrar a través de la dermis. Todas las respuestas fotobiológicas están influenciadas o determinadas por las propiedades ópticas de los tejidos, ya que estas propiedades determinan la dosis de radiación que recibe el tejido. Cuando la radiación llega a la piel, o a cualquier otro órgano, una parte será dispersada en el ambiente, otra parte será absorbida por varias capas de tejido y otra parte será transmitida a sucesivas capas de tejido hasta que la energía del haz

incidente haya sido disipada (Figura III.2.) (Anderson y Parrish, 1981; Wan y col., 1981 b; Parrish y col., 1985).

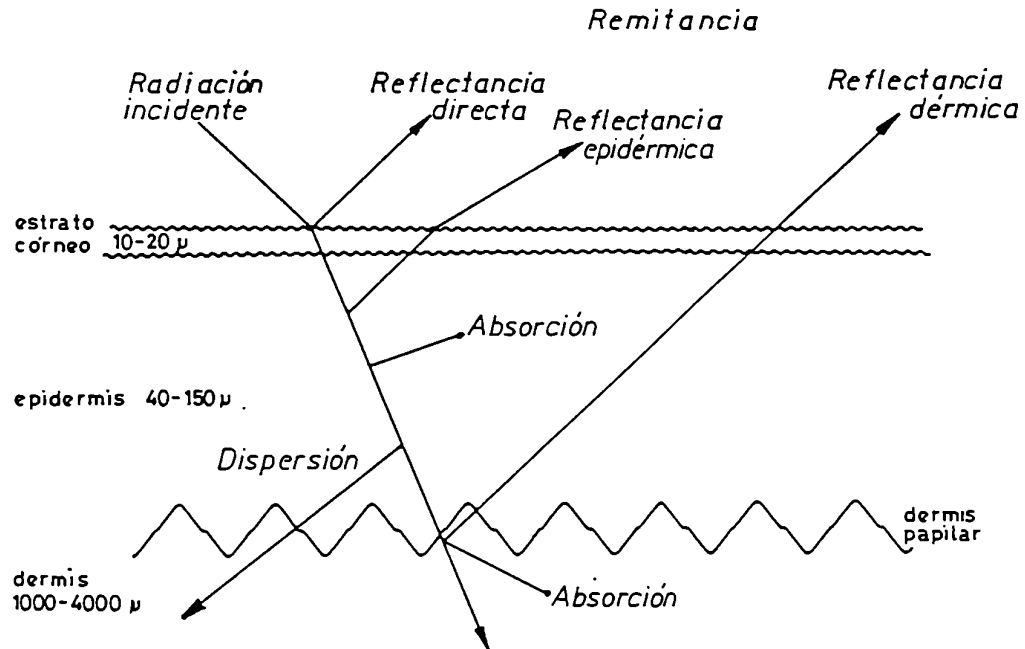


FIGURA III.2.: Propiedades ópticas de la piel

En el estrato córneo, una fracción del haz incidente (aproximadamente 5-7 %) es reflejada debido a que el índice de refracción ($n \approx 1,55$) es mucho mayor que el del aire ($n \approx 1,00$). El porcentaje de luz reflejada es constante para todas las longitudes de onda y para la piel blanca o negra. La luz de longitudes de onda del UV cercano, visible e infrarrojo cercano, atraviesa la epidermis y es reflejada por la dermis, retornando nuevamente al ambiente a través de la epidermis. La dispersión dérmica de la luz incidente es una función inversa de la longitud de onda. Así, el 50 % de la radiación UV que penetra en la epidermis es atenuada por reflexión en la dermis papilar, mientras que la radiación de 500 nm puede penetrar varios cientos de micrones y la radiación

infrarroja varios milímetros. La transmisión epidérmica de radiación de 330 a 1300 nm es alta en la piel blanca y disminuye marcadamente con el aumento de contenido de melanina a menores longitudes de onda (Parrish y col., 1985).

En la dermis y en otros órganos con alto contenido de tejido conectivo, la dispersión óptica limita la penetración de la radiación de menores longitudes de onda. La radiación UV y visible alcanza el nivel de los vasos sanguíneos cutáneos. Entre las bandas de absorción infrarroja del agua y las bandas de absorción del visible de la hemoglobina se encuentra la región espectral de mayor penetración (Anderson y Parrish, 1981; Wan y col., 1981 b; Parrish, 1983).

Parecería, sin embargo, que las longitudes de onda de luz de mayor importancia clínica en la producción de lesiones porfíricas son las de la banda de Soret. Esta luz del UV cercano es la más eficiente productora de porfirinas excitadas y las anormalidades histológicas observadas se encuentran en los niveles dérmico y epidérmico alcanzados por estos rayos.

El hecho que las lesiones clínicas producidas por exposición de la piel a luz de apropiada longitud de onda sean el resultado de un estado excitado fotodinámico *in vivo* sigue siendo una cuestión teórica. Sin embargo, a partir de estudios histológicos (Epstein y col., 1973; Kint y Geertz, 1973; Perrot y col., 1977) y clínicos (Magnus y col., 1959; Zalar y col., 1977) se obtuvieron evidencias que indican que el daño fotodinámico de biomoléculas dérmicas y epidérmicas inducido por porfirinas es el causante de las lesiones cutáneas. Es fácilmente demostrable que las porfirinas están presentes en exceso en la piel de pacientes con distintas formas de porfiria ya que no sólo se ha detectado fluorescencia en biopsias de piel de estos enfermos, sino que se ha medido el contenido de porfirinas (van Gog y Schothorst, 1973; Malina y col., 1978; Polo y col., 1983).

III.4. ESTUDIOS *in vitro* DE LA SENSIBILIZACION FOTOQUIMICA POR PORFIRINAS

La elucidación de los mecanismos de fotodaño inducido por porfirinas, incluyendo la contribución de mediadores secundarios de la inflamación liberados por ruptura de membranas celulares o subcelulares, ha sido objeto de intensa investigación. Se han estudiado los efectos de las porfirinas como fotosensibilizadores exógenos o endógenos, usando una amplia variedad de ambientes biológicos y sustratos del daño fototóxico, como soluciones de lípidos o proteínas (Verweij y col., 1981; Verweij y van Steveninck, 1982; van Steveninck y Dubbelman, 1984; Vincent y col., 1986 a y b), liposomas (Suwa y col., 1978; Spikes, 1983), membranas aisladas de eritrocitos (Ji, 1974; Dubbelman y col., 1980 a; Sandberg y Brun, 1982; Girotti y Deziel, 1983; Firey y Rodgers, 1988), eritrocitos intactos (de Goeij y col., 1975; Girotti, 1976; Dubbelman y col., 1978; Brun y Sandberg, 1985), organelas subcelulares (Sandberg y Romslo, 1981; Sandberg y col., 1982; Jori y col., 1986), organismos microbianos (Anwar y Prebble, 1977), células de mamíferos en cultivos de tejidos (Sandberg y col., 1981; Christensen y col., 1983; Lim y col., 1987), modelos animales (Gschnait y col., 1975 b; Konrad y col., 1975; Gomer y Razum, 1984) y humanos (Dubertret y col., 1982; Dougherty y col., 1983).

La eficiencia citotóxica relativa de distintas porfirinas que cubren el rango de alta solubilidad en agua hasta virtual insolubilidad, ha sido evaluada en cultivos de células (Kohn y Kessel, 1979; Sandberg y Romslo, 1980; Moan y col., 1987). Las células fueron incubadas en medios conteniendo distintas porfirinas y se expusieron a la luz. Se midieron tres parámetros indicadores del fotodaño inducido por porfirinas: 1) capacidad de la célula para transportar cicloleucina marcada a través de la membrana plasmática, 2) disminución de la hidrofobicidad de la superficie celular y 3) grado de "cross-linking" de las proteínas de membrana.

Se encontró que las porfirinas más hidrofóbicas eran totalmente ineficientes para mediar cambios en estos parámetros, adjudicándose esta falta de efectos a la incapacidad de esos tetrapirroles para dispersarse en medios acuosos. En cambio, las moléculas porfirínicas relativamente menos hidrofóbicas modificaron estos parámetros de integridad y función de la membrana celular más efectivamente que las porfirinas hidrofílicas. De estas experiencias se concluyó que las porfirinas hidrofóbicas están muy próximas a las moléculas "target" de la membrana celular y, por lo tanto, son capaces de inducir reacciones fotodinámicas mediadas por oxígeno singulete, produciendo daños en la membrana y, eventualmente, la muerte celular (Kohn y Kessel, 1979). También se demostró que la PROTO, una molécula muy hidrofóbica, produce un daño fotodinámico en mitocondrias de hígado de rata más severo que el provocado por COPRO, una molécula con solubilidad intermedia. El fotodaño mitocondrial se midió como ruptura de la membrana e inhibición de la fosforilación oxidativa y de la función respiratoria. A su vez, la COPRO fue más eficiente en la inducción del daño mitocondrial que la URO, la porfirina más hidrofílica (Sandberg y Romslo, 1980). Posteriormente se obtuvieron más evidencias que indican que las propiedades de solubilidad de las porfirinas son la clave determinante de su efectividad fotodinámica (Sandberg y Romslo, 1981; Sandberg y col., 1981, 1982). La PROTO fue más fototóxica para estructuras lipofílicas como membranas de eritrocitos, mitocondrias y enzimas unidas a membrana. En contraste, la URO fue más eficiente en la inducción del fotodaño de estructuras solubles como las enzimas citosólicas.

Estos resultados *in vitro* apoyan la teoría de la patogénesis de la protoporfiria, sugerida por evidencias histológicas, que propone que la rápida destrucción de las células endoteliales de los capilares dérmicos, cuyas membranas están constantemente bañadas por la PROTO transportada por albúmina o hemopexina en el plasma y son los sitios probables de absorción de la porfirina, es el evento tóxico inicial. Las células endoteliales se harían

así incompetentes, vertiendo su contenido intravascular en la dermis. La liberación de histamina, hidrolasas ácidas lisosomales u otros mediadores inflamatorios unidos a las organelas, también podría participar en las reacciones posteriores a la lisis inducida por PROTO, provocando las sensaciones dolorosas que notan en la piel los pacientes porfíricos después de la exposición al sol (Lamola y col., 1981). De acuerdo con esta teoría, las porfirinas hidrofílicas serían menos atraídas hacia las membranas lipofílicas y, por lo tanto, menos efectivas para inducir el daño de membrana.

El medio por el cual las porfirinas hidrosolubles pueden fotosensibilizar preferencialmente biomoléculas de la epidermis y de la zona de la membrana basal está menos claramente apoyado por datos de laboratorio. Una teoría indica que estos sitios son relativamente hidrofílicos y, por lo tanto, atraen a las porfirinas hidrofílicas transportadas en su vecindad en el espacio extravascular (Poh-Fitzpatrick, 1985). Otra teoría alternativa sostiene que estas porfirinas son sintetizadas en o cerca de estos sitios de acumulación, reflejando la universalidad del defecto genético presente, que sería operativo a diferentes niveles en las células somáticas (Bickers y col., 1977; Afonso y col., 1987; Vázquez y col., 1987 a).

Aún menos claros son los patrones clínicos de fototoxicidad en los síndromes porfíricos que manifiestan la acumulación de casi todo el espectro de porfirinas hidrofílicas e hidrofóbicas, por ejemplo la PV (Day y col., 1978). Se podría especular que las porfirinas más hidrofóbicas de 2 y 3 carboxilos, y las relativamente hidrofóbicas, de 4 carboxilos, sintetizadas en el hepatocito, son eficientemente eliminadas a los compartimientos biliar y fecal, donde son típicamente medidas en gran cantidad, pero pobremente diseminadas por el plasma en la piel (Longas y Poh-Fitzpatrick, 1982).

***MATERIALES
Y METODOS***

CAPITULO I

MATERIALES

	Página
I.1. Equipos utilizados	51
I.2. Fuentes enzimáticas	52
I.2.1. Animales	52
I.2.2. Muestras de sangre	52
I.2.3. Enzimas puras	52
I.3. Secuestradores y fotosensibilizadores	52
I.4. Aminoácidos	53
I.5. Reactivos	53

I. MATERIALES

I.1. EQUIPOS UTILIZADOS

Los homogenatos se prepararon usando un Potter Elvehjem con émbolo de teflón.

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas SORVALL RC-5B o CENTRICON H-401 (KONTRON HERMLE), y en centrífugas de mesa ROLCO CM-36 o JOUAN B3.11.

Para las determinaciones espectrofotométricas se usaron espectrofotómetros BECKMAN modelo 35, SHIMADZU modelo UV-210 A o METROLAB modelo RC 325BD. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro SHIMADZU modelo RF-510. Los espectros de absorción de enzimas y aminoácidos se realizaron en un espectrofotómetro por arreglo de diodos HEWLETT PACKARD modelo HP8452A.

Las placas de HP-TLC (Merck, RP-2F₂₅₄S para nanocromatografía en capa fina) se leyeron en un lector de placas SHIMADZU High speed TLC Scanner modelo CS-920.

En la calibración de las columnas de Sephadex G-75, G-100, G-150, y en la purificación de enzimas a través de las mismas, se utilizó un colector de fracciones modelo FRAC-300 (Pharmacia Fine Chemicals).

Para la electroforesis de las enzimas purificadas se empleó una cuba de acrílico fabricada en la Universidad de Margburg (Alemania) y una fuente POWER SUPPLY modelo 500 (BioRad Laboratories).

I.2. FUENTES ENZIMATICAS

I.2.1. Animales

Se utilizaron ratones macho cepa CF1, de aproximadamente 20 g de peso, alimentados con dieta normal para animales de laboratorio (Purina 3) y agua *ad libitum*. Los animales fueron donados por el Centro Panamericano de Zoonosis.

I.2.2. Muestras de sangre

Se usó sangre humana normal proveniente de la Unidad de Hemoterapia del Hospital Clínico San Carlos (Madrid - España) y de los bancos de sangre del Hospital Zubizarreta y del Hospital Pirovano (Buenos Aires - Argentina).

I.2.3. Enzimas puras

La enzima rodenasa (E.C. 2.8.1.1) purificada de hígado bovino procedía de Sigma Chem. Co. (St. Louis, Missouri); láctico deshidrogenasa (LDH, E.C. 1.1.1.28) purificada de músculo de conejo, y glutámico deshidrogenasa (GLDH, E.C. 1.4.1.3) purificada de hígado bovino, procedían de Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania); succinil CoA sintetasa (Succ.CoA-S, E.C. 6.2.1.5), proveniente de *Saccharomyces cerevisiae* fue generosamente provista por la Lic. Susana Correa García.

I.3. SECUESTRADORES Y FOTSENSIBILIZADORES

La enzima superóxido dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1), purificada de eritrocitos de bovino, procedía de Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Alemania) y la enzima catalasa (E.C. 1.11.1.6) purificada de hígado bovino procedía de Sigma Chemical Company (St. Louis, EEUU). Azida de sodio, cisteína, dimetilsulfóxido (DMSO),

etanol, glucosa y glutatión reducido (GSH) procedían de Merck (Darmstadt, Alemania); histidina y luminol (3-aminofthalhidrazida) de Laboratorios Scharlau (Barcelona, España), ATP, DETAPAC (ácido dietilentetraminpentacético), EDTA, α -tocoferol (α -T), hidroxitolueno butilado (BHT), azul de metileno y rosa de Bengala de Sigma Chem. Co. (St. Louis, EEUU); o-fenantrolina de Carlo Erba (Milán, Italia); riboflavina de Laboratorios Roche (Buenos Aires, Argentina) y ácido ascórbico de Laboratorio Suizo-Argentino (Buenos Aires, Argentina). Las porfirinas procedían de Porphyrin Products (Logan, EEUU).

I.4. AMINOACIDOS

Los aminoácidos utilizados en la determinación de espectros de absorción (cistina, cisteína, metionina, histidina, tirosina y triptofano) procedían de Merck. (Darmstadt, Alemania).

I.5. REACTIVOS

Los reactivos empleados fueron obtenidos de Merck o de Sigma Chem. Co.

Los geles de Sephadex G-75, G-100 y G-150 provenían de Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Suecia).

METODOS

	Página
II.1. Preparación de porfirinas libres	54
II.1.1. Hidrólisis y solubilización de URO, COPRO y PENTA	54
II.1.2. Hidrólisis y solubilización de PROTO	55
II.1.3. Solubilización de mesoporfirina	55
II.2. Preparación de los tejidos	55
II.2.1. Eritrocitos	55
II.2.2. Hígado	56
II.3. Purificación de las enzimas provenientes de glóbulos rojos	56
II.3.1. Purificación de ALA-D	56
II.3.2. Purificación de PBGasa	58
II.3.3. Purificación de deaminasa	59
II.3.4. Purificación de URO-D	61
II.4. Tratamiento de las enzimas	61
II.4.1. Tratamiento con porfirinas	61
II.4.2. Tratamiento con otros fotosensibilizadores	65
II.4.3. Otros tratamientos	65
II.4.3.1. Sustratos	65
II.4.3.2. Secuestradores de especies reactivas	65

	Página
II.5. Determinaciones enzimáticas	66
II.5.1. Succinil CoA sintetasa	66
II.5.2. δ -Aminolevúlico sintetasa	66
II.5.3. δ -Aminolevúlico dehidrasa	67
II.5.4. Porfobilinogenasa y deaminasa	68
II.5.5. Uroporfirinógeno decarboxilasa	69
II.5.6. Rodenasa	70
II.5.7. Láctico deshidrogenasa	71
II.5.8. Glutámico deshidrogenasa	71
II.5.9. Unidad enzimática	71
II.6. Determinación de proteínas	72
II.7. Determinación de grupos sulfhidrilos totales	72
II.8. Determinación de grupos amino libres	73
II.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida	73
II.9.1. Preparación de los geles	73
II.9.2. Preparación y siembra de las muestras	74
II.9.3. Desarrollo de las electroforesis	74
II.9.4. Revelado de los geles	75

II. METODOS

II.1. PREPARACION DE PORFIRINAS LIBRES

En todas las experiencias se usaron porfirinas libres; URO, PENTA, COPRO y PROTO fueron hidrolizadas a partir de sus correspondientes ésteres metálicos.

II.1.1. Hidrólisis y solubilización de URO, COPRO y PENTA

Los ésteres metálicos de URO, COPRO y PENTA se hidrolizaron según la metodología descrita por Mauzerall y Granick (1958). El residuo de éster metálico se disolvió en unas gotas de HCl 25 % y se guardó 24 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Las porfirinas libres se precipitaron a pH 3,0-3,5 con NaOH 10 M y se centrifugaron a 600 x g durante 15 minutos. El precipitado se lavó dos veces con agua destilada y se redisolvió en NaOH 25 mM. Se diluyó una alícuota de la solución en TCA 5 % y se leyó la absorbancia a 380 nm, 430 nm y a la longitud de onda de máxima absorbancia (URO: 407 nm, PENTA: 405 nm, COPRO: 403 nm). La concentración de las soluciones de porfirinas libres se determinó mediante el siguiente cálculo:

$$\mu\text{g porfirina/ml} = (2 A_{\text{max}} - A_{380} - A_{430}) \times d \times f$$

donde A = absorbancias a las longitudes de onda indicadas por los subíndices

d = dilución

f = 1,008 para URO; 1,216 para PENTA y 1,287 para COPRO

II.1.2. Hidrólisis y solubilización de PROTO

La hidrólisis de PROTO se realizó siguiendo el método de Falk (1964).

El éster se disolvió en HCl 7 N y se conservó durante 4 horas en oscuridad a temperatura ambiente. La porfirina libre se precipitó a pH 3,2 con NaOH (c) y se centrifugó a 600 x g durante 15 minutos. El precipitado se lavó dos veces con agua destilada y se disolvió en KOH 0,5 M:Etanol (1:1). Se diluyó una alícuota de la solución en TCA 5 % y se leyó la absorbancia a 380 nm, 430 nm y a la longitud de onda de máxima absorbancia (409 nm). La concentración de la solución de PROTO se calculó según la ecuación:

$$\mu\text{g PROTO/ml} = (2 A_{\text{max}} - A_{380} - A_{430}) \times d \times f$$

donde A = absorbancias a las longitudes de onda indicadas en los subíndices

d = dilución

f = 2,170

II.1.3. Solubilización de mesoporfirina

La solución de mesoporfirina (MESO) se preparó por disolución de la porfirina libre cristalina en KOH 0,5 M:Etanol (1:1). Para la determinación de la concentración se efectuó el mismo procedimiento descrito para PROTO (ítem II.1.2.).

II.2. PREPARACION DE LOS TEJIDOS

II.2.1. Eritrocitos

En la mayoría de las experiencias se usó sangre proveniente de sangrías de enfermos bronquiales que no presentaban afecciones porfíricas o de dadores voluntarios sanos.

La sangre se recogió sobre heparina, se centrifugó durante 30 minutos a 600 x g para descartar el plasma, y los glóbulos rojos (GR) se lavaron dos veces con solución fisiológica. Los GR se hemolizaron por congelamiento y descongelamiento y se diluyeron 1:15 con buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4 para las determinaciones de ALA-D, PBGasa y deaminasa, y 1:2 con buffer fosfato de sodio 0,067 M pH 7,0 para la determinación de URO-D.

II.2.2. Hígado

Para la determinación de ALA-S se usó hígado de ratones ayunados durante 16 horas. Los animales se trataron vía i.p. con una solución de heparina (625 U/ml) 10 minutos antes de su sacrificio, en un volumen no mayor del 1 % del peso corporal, luego se sacrificaron en una cámara de éter. Posteriormente se realizó una perfusión cardíaca con solución fisiológica fría y se extrajo el hígado para su procesamiento inmediato.

Los órganos perfundidos se homogeneizaron en sacarosa 0,25 M (1:10, p/v). El homogenato obtenido se centrifugó a 600 x g durante 10 minutos y el sobrenadante resultante se centrifugó 15 minutos a 15.000 x g. El precipitado (fracción mitocondrial) se resuspendió en buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4 y se le agregó Tritón X-100 al 5 % en una proporción 1:10 (v/v).

II.3. PURIFICACION DE LAS ENZIMAS PROVENIENTES DE GLOBULOS ROJOS

II.3.1. Purificación de ALA-D

La sangre se centrifugó durante 30 minutos a 600 x g, se descartó el plasma y los GR se lavaron dos veces con solución fisiológica. Los eritrocitos se hemolizaron por agregado de igual volumen de agua destilada fría; la solución se mantuvo en baño de hielo durante 1 hora con agitación constante y se centrifugó durante 45 minutos a 20.000 x g para descartar las membranas

celulares. Para separar la hemoglobina, la solución resultante fue agregada a una suspensión 1:1 (v/v) de DEAE celulosa equilibrada en buffer fosfato de sodio 3 mM pH 7,0; se dejó en contacto durante 30 minutos y luego se centrifugó durante 15 minutos a 7.000 x g. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con el mismo buffer hasta que el sobrenadante resultó incoloro. Para separar las proteínas restantes, se lavó 3 veces la DEAE celulosa con 90 ml de buffer fosfato de sodio 134 mM pH 7,0 cada vez, centrifugando durante 15 minutos a 7.000 x g. Se reunieron los sobrenadantes y se agregó sulfato de amonio hasta 30 % de saturación, la mezcla se mantuvo en baño de hielo con agitación constante durante 30 minutos y luego se centrifugó a 10.000 x g durante 40 minutos. Se descartó el precipitado y con el sobrenadante se realizó una segunda precipitación con sulfato de amonio hasta 55 % de saturación, siguiendo el mismo procedimiento que en la anterior. El precipitado se resuspendió en 4 ml de buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 6,8 y se aplicó a una columna de Sephadex G-100 de 2,5 cm de diámetro x 55 cm de largo (270 ml de gel) para separar el resto de hemoglobina que hubiera quedado después de los tratamientos descritos. Las proteínas se eluyeron de la columna con el mismo buffer, se reunieron las fracciones que tenían actividad de ALA-D y se reprecipitaron con sulfato de amonio hasta 55% de saturación. Luego de la centrifugación a 10.000 x g durante 40 minutos, se resuspendió el precipitado en 4 ml de buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 6,8 y se aplicó a una columna de Sephadex G-150 de 2,5 cm de diámetro x 45 cm de largo (220 ml de gel), eluyéndose las proteínas con el mismo buffer. En cada paso de la purificación se reservaron alícuotas para la determinación de actividad enzimática y proteínas. La Tabla II.1. muestra el rendimiento y el grado de purificación del ALA-D.

TABLA II.1.: Cuadro de purificación de ALA-D

FRACCION	PROTEINAS TOTALES (mg)	UNIDADES TOTALES	ACTIVIDAD ESPECIFICA	REND. %	PURIF.
Hemolizado	68.825	9.840	0,14	100	1
DEAE-celulosa	3.796	7.654	2,02	78	14
(NH ₄) ₂ SO ₄ 30-55 %	344	3.927	11,42	40	82
Sephadex G-100	118	1.485	12,63	15	90
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0-55 %	101	1.388	13,73	14	98
Sephadex G-150	69	1.168	16,94	12	121

II.3.2. Purificación de PBGasa

Los eritrocitos se aislaron, lavaron y hemolizaron siguiendo el mismo procedimiento que en la purificación de ALA-D (ítem II.3.1.).

Para separar la hemoglobina se agregó el hemolizado de GR a una suspensión 1:1 (v/v) de DEAE celulosa equilibrada en buffer fosfato de potasio 7 mM pH 6,8; la mezcla se dejó en contacto durante 30 minutos, luego se centrifugó durante 15 minutos a 7.000 x g y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con el mismo buffer hasta que el sobrenadante resultó incoloro. Para separar las restantes proteínas, se lavó tres veces la resina con 90 ml de una mezcla (1:1) de buffer fosfato de potasio 7 mM pH 8,6 más cloruro de sodio 0,12 M cada vez, centrifugando a 7.000 x g durante 20 minutos. Sobre el sobrenadante de las

centrifugaciones se realizó una precipitación con sulfato de amonio, conservándose la fracción que precipita entre 30 y 70 % de saturación. El precipitado resultante se resuspendió en 10 ml de buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 8,2 y se aplicó a una columna de Sephadex G-100 de 2,5 cm de diámetro x 55 cm de largo (270 ml de gel). Las proteínas se eluyeron con el mismo buffer y se reunieron las fracciones que tenían actividad de PBGasa. En todos los pasos de purificación se reservaron alícuotas para la medición de actividad enzimática y proteínas. La Tabla II.2. muestra el rendimiento y el grado de purificación de PBGasa.

TABLA II.2.: Cuadro de purificación de PBGasa

FRACCION	PROTEINAS TOTALES (mg)	UNIDADES TOTALES	ACTIVIDAD ESPECIFICA	REND. %	PURIF.
Hemolizado	88.663	1.770	0,020	100	1
DEAE-celulosa	3.826	293	0,076	17	4
(NH ₄) ₂ SO ₄ 30-70 %	237	285	1,210	16	60
Sephadex G-100	17	180	9,540	10	477

II.3.3. Purificación de deaminasa

Para la obtención del hemolizado de GR libre de hemoglobina, se partió de sangre entera que fue tratada siguiendo el procedimiento descrito para la purificación de PBGasa (ítem II.3.2.). El sobrenadante resultante del tratamiento con DEAE-celulosa fue sometido a precipitación con sulfato de amonio, conservándose la

fracción que precipita entre 30 y 80 % de saturación. El precipitado obtenido se resuspendió en 15 ml de buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 8,2 y se calentó en baño de agua a 70 °C durante 15 minutos para separar la isomerasa del complejo PBGasa. Se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 x g y se descartó el precipitado. Para concentrar las proteínas restantes, se trató el sobrenadante con sulfato de amonio hasta 80 % de saturación, se centrifugó 40 minutos a 10.000 x g y el precipitado resultante se resuspendió en 2,4 ml de buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 8,2. La solución se aplicó a una columna de Sephadex G-100 de 2,5 cm de diámetro x 55 cm de largo (270 ml de gel) y se eluyó con el mismo buffer, reuniéndose las fracciones que tenían actividad de deaminasa. En todos los pasos de purificación se reservaron alícuotas para la determinación de actividad enzimática y proteínas. La Tabla II.3. muestra el rendimiento y el grado de purificación de deaminasa.

TABLA II.3.: Cuadro de purificación de deaminasa

FRACCION	PROTEINAS TOTALES (mg)	UNIDADES TOTALES	ACTIVIDAD ESPECIFICA	REND. %	PURIF.
Hemolizado	83.851	6.491	0,07	100	1
DEAE-celulosa	22.880	5.590	0,24	86	3
(NH ₄) ₂ SO ₄ 30-80 %	410	1.820	4,44	28	63
Calentamiento 70 °C	94	1.020	10,89	16	155
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0-80 %	79	945	11,94	15	171
Sephadex G-100	12	900	74,38	14	1.071

II.3.4. Purificación de URO-D

El hemolizado de GR libre de hemoglobina se obtuvo a partir de sangre entera siguiendo el procedimiento descrito para la purificación de ALA-D (ítem II.3.1.). El sobrenadante resultante del tratamiento con DEAE celulosa fue sometido a precipitación con sulfato de amonio, conservándose la fracción que precipita entre 55 y 75 % de saturación. El precipitado obtenido se resuspendió en 8 ml de buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4 y se aplicó a una columna de Sephadex G-75 de 2,5 cm de diámetro x 45 cm de largo (220 ml de gel). Se eluyeron las proteínas con el mismo buffer, se reunieron las fracciones con actividad de URO-D, se reprecipitaron con sulfato de amonio hasta 75 % de saturación y se recromatografiaron en Sephadex G-75. La columna se eluyó con buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 7,4 y se reunieron las fracciones con actividad de URO-D. En todos los pasos de purificación se reservaron alícuotas para la determinación de actividad enzimática y proteínas. La Tabla II.4. muestra el rendimiento y el grado de purificación de URO-D.

II.4. TRATAMIENTO DE LAS ENZIMAS

II.4.1. Tratamiento con porfirinas

Los hemolizados de GR diluidos se colocaron en placas de Petri de 5 cm de diámetro (Figura II.1.) conteniendo la mínima cantidad necesaria de solución de porfirina para lograr la concentración requerida en cada experiencia. Las placas se colocaron en un baño de agua a la temperatura deseada y se ubicaron bajo una lámpara de luz UV (Philips HPW 125) para obtener una irradiancia de 40 W/m^2 . Las muestras en oscuridad se colocaron en el mismo baño de agua, totalmente protegidas de la luz con papel metalizado. Paralelamente se hicieron controles sin porfirinas ubicados en las mismas condiciones de iluminación y oscuridad (Figura II.1.).

En los controles, cuya actividad se toma como 100 %, la preparación enzimática se conservó sin tratamiento, a 4 °C, durante todo el tiempo que duró cada experiencia.

TABLA II.4.: Cuadro de purificación de URO-D

FRACCION	PROTEINAS TOTALES (mg)	UNIDADES TOTALES	ACTIVIDAD ESPECIFICA	REND. %	PURIF.
Hemolizado	56.800	11.400	0,20	100	1
DEAE celulosa	4.980	11.044	22,21	97	111
(NH ₄) ₂ SO ₄ 55-75 %	37	5.402	144,64	47	723
Sephadex G-75	24	3.500	153,58	31	768
(NH ₄) ₂ SO ₄ 0-75 %	18	3.309	180,25	29	901
Sephadex G-75	14	3.010	209,05	26	1.045

Una vez concluído el tratamiento se agregó resina DOWEX 1-X8 a las muestras y controles (150 mg resina/10 µg porfirina) para extraer las porfirinas. Se centrifugaron las mezclas 5 minutos a 600 x g y se utilizaron los sobrenadantes para las determinaciones enzimáticas. En todos los casos se comprobó la ausencia de porfirinas en dichos sobrenadantes.

Las fracciones mitocondriales provenientes de los homoge_natos de hígado de ratón fueron sometidas al mismo tratamiento que los hemolizados de GR.

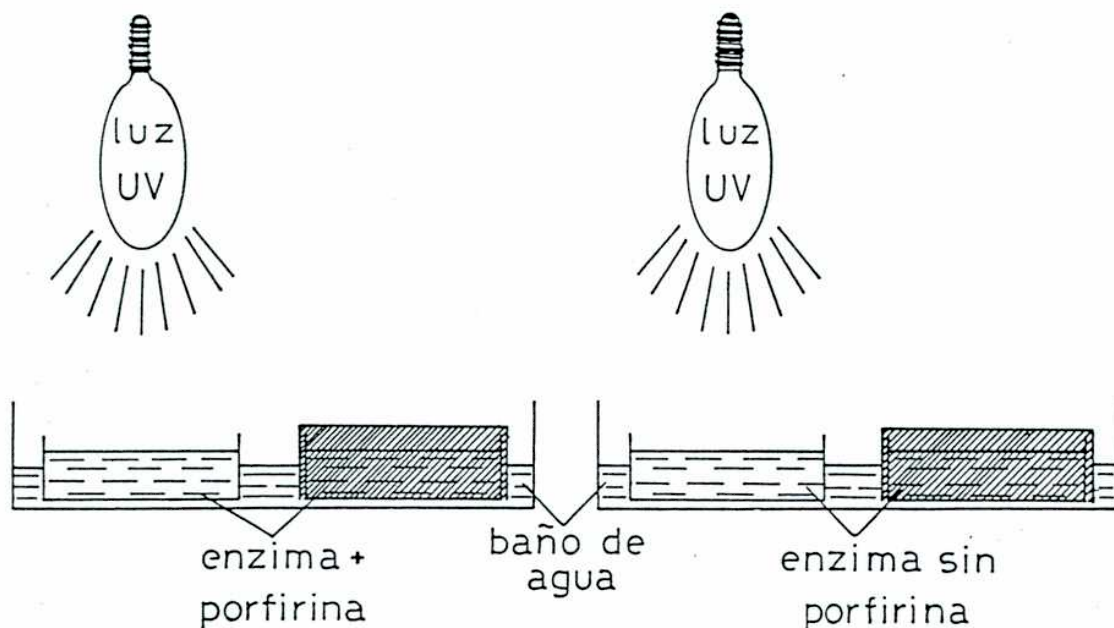


FIGURA II.1.: Sistema de iluminación para el tratamiento de las enzimas

Las enzimas puras solubilizadas en buffer (rodenasa: 0,10 mg/ml de buffer TRIS-HCl 0,05 M pH 8,7; LDH: 0,07 mg/ml de Buffer fosfato de sodio 0,01 M pH 7,4 y GLDH: 0,15 mg/ml de buffer fosfato de potasio 0,1 M pH 7,6) y las enzimas purificadas de GR y de *Rp. spheroides* fueron tratadas con luz u oscuridad en presencia o ausencia de URO I, en las mismas condiciones que los hemolizados de GR.

Se comprobó que el tratamiento con resina DOWEX 1-X8 no afectaba la actividad de las enzimas estudiadas ni el contenido de proteínas de las distintas muestras (Tabla II.5.).

TABLA II.5.: Efecto de la resina DOWEX 1-X8 sobre la actividad enzimática y el contenido de proteínas

ENZIMA	AGREGADO DE RESINA	ACTIVIDAD (U/ml)	PROTEINAS (mg/ml)	ACTIVIDAD ESPECIFICA
ALA-D (n = 15)	no	0,970±0,050	35,00± 4,40	0,028± 0,002
	si	0,960±0,090	34,10± 3,50	0,028± 0,003
PBGasa (n = 15)	no	16,460±1,020	35,00± 4,40	0,470± 0,029
	si	16,450±1,170	34,10± 3,50	0,482± 0,034
Deaminasa (n = 15)	no	40,310±1,090	35,00± 4,40	1,152± 0,031
	si	40,290±1,180	34,10± 3,50	1,181± 0,034
URO-D (n = 20)	no	16,610±1,150	278,30±10,50	0,060± 0,004
	si	16,580±1,270	276,70±11,20	0,059± 0,004
ALA-S (n = 5)	no	0,025±0,007	9,88± 1,19	(2,530±0,708) × 10 ⁻³
	si	0,023±0,007	9,90± 1,20	(2,323±0,707) × 10 ⁻³
Succ.CoA-S (n = 5)	no	0,296±0,018	9,95± 1,14	0,030± 0,002
	si	0,303±0,026	9,98± 1,19	0,030± 0,003
Rodanasa (n = 5)	no	10,820±0,760	0,09± 0,01	120,200± 8,400
	si	10,790±0,890	0,08± 0,01	134,800±11,100
LDH (n = 5)	no	63,700±5,800	0,07± 0,01	910,000±82,000
	si	65,000±2,500	0,07± 0,02	929,000±36,000
GLDH (n = 5)	no	186,200±7,000	0,15± 0,01	1.241,000±47,000
	si	185,400±6,200	0,14± 0,01	1.324,000±44,000

A 3 ml de cada preparación enzimática se le agregaron 500 mg de resina DOWEX 1-X8. Las mezclas se centrifugaron 5 minutos a 600 x g y en los sobrenadantes se determinó actividad enzimática y contenido de proteínas. Cada valor representa el promedio ± la desviación estándar. n = número de determinaciones realizadas por duplicado

II.4.2. Tratamiento con otros fotosensibilizadores

Los hemolizados de GR diluídos se trataron en presencia de luz UV o luz blanca, o en oscuridad en las condiciones detalladas, reemplazando las porfirinas por luminol, riboflavina, rosa de Bengala o azul de metileno. Se hicieron controles en los que los fotosensibilizadores, en las mismas concentraciones que las muestras tratadas, se agregaron al sistema de incubación para la medición de actividad de cada enzima.

II.4.3. Otros tratamientos

II.4.3.1. Sustratos

Se preincubaron los hemolizados de GR, durante 30 minutos a 0 °C en oscuridad, con el sustrato correspondiente a cada enzima, en la misma concentración usada para medir actividades enzimáticas. Luego se agregó URO I 10 μ M y se sometieron las mezclas a iluminación con luz UV u oscuridad. Al cabo de 2 horas se extrajeron los compuestos agregados como se detalló anteriormente, usando resina DOWEX 2-X8 para la extracción de PBG y URO, y una mezcla de resina DOWEX 1-X8 y 50-X8 para la extracción de ALA y URO.

II.4.3.2. Secuestradores de especies reactivas

Los hemolizados de GR se preincubaron durante 30 minutos a 0 °C en presencia de histidina 15 mM; azida de sodio 15 mM; cisteína 15 mM; ferricianuro de potasio 1 mM; α -T 20 μ M; BHT 20 μ M; ácido ascórbico 20 mM; SOD 10 μ M; catalasa 200 nM; GSH 15 mM; etanol 15 mM; glucosa 11 mM; DMSO 1,2 μ M; o-fenantrolina 15 mM; DETAPAC 1 mM; EDTA 1 mM o ATP 1 mM. Luego se agregó URO I y se colocaron las preparaciones en el sistema de iluminación u oscuridad y se trataron como se describió previamente.

Se hicieron controles en los que los distintos "scavengers" a las mismas concentraciones que las empleadas en las

muestras tratadas fueron agregados a los sistemas de incubación para la determinación de actividad de cada enzima.

II.5. DETERMINACIONES ENZIMATICAS

II.5.1. Succinil CoA sintetasa

Para la determinación de Succ.CoA-S se utilizó un extracto de *Rp. spheroides* sonificado durante 3 minutos a 14 micrones. La actividad enzimática se midió según el método descrito por Wider y Tigier (1971). La mezcla estándar de incubación contenía, en un volumen final de 2 ml: 50 μ moles de succinato de sodio; 0,48 μ moles de CoA; 0,96 mmoles de hidroxilamina; 11,6 μ moles de GSH; 3 μ moles de $MgCl_2$; 1,5 μ moles de ATP; 0,46 μ moles de buffer TRIS-HCl pH 7,4 y 0,5 ml de la preparación enzimática (aproximadamente 5 mg de proteína). La incubación se realizó aeróbicamente, en oscuridad, con agitación mecánica, a 37 °C durante 30 minutos. Finalizada la incubación, se agregó 1 ml de mezcla desproteinizante que contenía TCA 25 %:FeCl₃ 5 % en HCl 0,1 M:HCl 3 M (1:1:1 v/v/v), se centrifugó durante 30 minutos a 600 x g y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 540 nm (Kaufman y Alivisatos, 1955). Los valores de succinil hidroxamato formado se obtuvieron de curvas de calibración realizadas con distintas concentraciones de este compuesto (Wider de Xifra, 1972).

II.5.2. δ -Aminolevúlico sintetasa

La actividad de ALA-S se midió según el método descrito por Lombardo y col. (1988). La mezcla estándar de incubación contenía, en un volumen final de 1 ml: 45 μ moles de succinato de sodio; 90 μ moles de glicina; 0,24 μ moles de CoA; 0,27 μ moles de fosfato de piridoxal; 2 μ moles de EDTA; 5,6 μ moles de $MgCl_2$; 4,5 μ moles de ATP; 23 μ moles de buffer TRIS-HCl pH 7,4; 50 μ l de suspensión de Succ.CoA-S de *S. cerevisiae* (1 ml de esta suspensión

cataliza la formación de 58 μ moles de succinil hidroxamato en una hora a 37 °C) y 0,5 ml de la preparación enzimática (aproximadamente 5 mg de proteína). La incubación se realizó aeróbicamente con agitación mecánica, a 37 °C durante 30 minutos. La reacción se detuvo por agregado de 1 ml de TCA 10 %. Después de la centrifugación a 600 x g por 30 minutos, se tomó 1 ml de sobrenadante para la cuantificación del ALA formado.

La cuantificación de ALA se realizó por el método de Mauzerall y Granick (1956) como describen Moore y Labbe (1964). A una alícuota del sobrenadante se le agregó buffer acético/acetato 1 M pH 4,6 y acetilacetona, y se realizó la condensación a 80 °C durante 10 minutos para obtener el ALA pirrol. Luego de enfriada la mezcla se agregó igual volumen de reactivo de Ehrlich modificado, se dejó reaccionar durante 8 minutos y se leyó la absorbancia a 553 nm. La cantidad de ALA formado se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles ALA/ml enzima} = \frac{A_{553} \cdot 10^3 \cdot V_f \cdot d}{\epsilon \cdot V_{enz}}$$

donde A_{553} = absorbancia a 553 nm

d = factor de dilución por agregado de buffer para condensación

V_f = volumen después de desproteínizar la mezcla de incubación

ϵ = $7,2 \times 10^6$ = coeficiente de extinción molar

V_{enz} = volumen de enzima incubado

II.5.3. δ -Aminolevúlico dehidrasa

Se utilizó el método de Batlle y col. (1967) para la detención de actividad de ALA-D. El sistema de incubación contenía: 5 μ moles de ALA; 100 μ moles de buffer fosfato de sodio pH 6,8 y 0,25 ml de extracto enzimático (aproximadamente 8,0 mg de

proteína). Luego de 1 hora de incubación a 37 °C en aerobiosis, la reacción se detuvo por agregado de 0,1 ml de TCA 50 %, y se centrifugó a 600 x g durante 20 minutos.

El contenido de PBG se determinó mediante la reacción de Ehrlich (Moore y Labbe, 1964), aplicando la siguiente expresión para su cálculo:

$$\text{nmoles PBG/ml enzima} = \frac{A_{555} \times V_{\text{inc}} \times 10^6}{\epsilon \times \text{PM} \times V_{\text{enz}}}$$

donde A_{555} = absorbancia de la solución a 555 nm

V_{inc} = volumen final de incubación

ϵ = 113,6 (absorbancia de una solución de PBG de concentración 1 mg/ml)

PM = 226

V_{enz} = volumen de enzima incubado

II.5.4. Porfobilinogenasa y deaminasa

Se procedió según la metodología descrita por Batlle y col.(1978 b). El sistema de incubación contenía, en un volumen final de 1,5 ml, 75 μ moles de buffer TRIS-HCl pH 8,2; 75 μ moles de NaCl; 150 μ moles de MgCl_2 ; 30 μ g de PBG y 0,5 ml de solución enzimática (aproximadamente 17 mg de proteína).

Para determinar la actividad de PBGasa, se incubó la mezcla a 37 °C, en aerobiosis. Para la determinación de la actividad de deaminasa la incubación se realizó a 45 °C, en aerobiosis.

Luego de 1 hora de incubación se detuvo la reacción por agregado de 1,5 ml de TCA 10 % y se centrifugó a 600 x g durante 20 minutos. Los sobrenadantes se iluminaron con luz blanca durante 20 minutos para permitir la oxidación de los porfirinógenos a porfirinas.

La cantidad total de porfirinas formadas se determinó

según Rimington (1960). Se leyó la absorbancia a 380 nm, 430 nm y en el máximo de la banda de Soret (A_{\max}) y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{nmoles de porfirinas/ml enzima} = \frac{(2 A_{\max} - A_{380} - A_{430}) \times f \times V_f}{V_{\text{enz}}}$$

donde A = absorbancias a las longitudes de onda indicadas en los subíndices

$$f = 1,008$$

$$V_f = \text{volumen final}$$

$$V_{\text{enz}} = \text{volumen de enzima incubado}$$

II.5.5. Uroporfirinógeno decarboxilasa

Para la medición de la actividad de URO-D se siguió el método descrito por Afonso y col. (1985). El UROgen III se preparó por reducción de URO III con Na/Hg 3 % en relación 1 g Na/Hg/ml de solución de porfirina. La mezcla se filtró sobre lana de vidrio en ambiente de nitrógeno y se llevó a pH 7,0 con H_3PO_4 40 %.

La mezcla de incubación para URO-D contenía, en un volumen final de 3 ml: 3 mmoles de GSH; 0,3 mmoles de EDTA; 20 mmoles de buffer fosfato de sodio pH. 7,0; 36 nmoles de UROgen III y 1 ml de solución enzimática (aproximadamente 200 mg de proteína). Se incubó a 37 °C, en oscuridad y atmósfera de nitrógeno. La reacción se detuvo por agregado de TCA 50 %, se filtró sobre papel embebido en TCA 5 % y el precipitado se lavó 2 veces con el mismo TCA. Se reunieron el filtrado y las soluciones provenientes de los lavados para la esterificación de las porfirinas según el método descrito por Polo y col. (1988). La mezcla se llevó a pH 3,0-3,5 con ácido acético glacial, se agregó talco tipo Venecia (Merck) y se centrifugó 10 minutos a 600 x g. El precipitado se secó en estufa a 100 °C durante 1 hora, luego se resuspendió en 5 ml de mezcla esterificante (H_2SO_4 (c)/ CH_3OH , 1:9 v/v) y se

mantuvo en estufa a 60 - 70 °C durante 20 minutos. Finalizada la reacción, se extrajeron las porfirinas esterificadas en cloroformo. El extracto clorofórmico se cromatografió en HP-TLC; el solvente de cromatografía contenía 7,5 ml de tolueno; 2,0 ml de acetato de etilo y 0,5 ml de metanol.

En un lector de placas se leyó el porcentaje de cada porfirina obtenida a partir de UROgen y se calculó la cantidad de porfirinas totales decarboxiladas según la fórmula:

$$\text{nmoles (4+5+6+7)COOH/ml enzima} = \left(\sum_{i=4}^7 \frac{\%_i \times m}{100} \right) \times \frac{1}{V_{inc}}$$

donde m = cantidad de UROgen incubado

$\%_i$ = porcentaje de cada porfirina (COPRO, PENTA, HEXA o FIRIA) en la placa cromatográfica

V_{inc} = volumen de enzima incubado

II.5.6. Rodenasa

El método utilizado para determinar la actividad de rodénasa se basa en el descrito por Sörbo (1955). La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 2 ml: 100 μ moles de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; 100 μ moles de buffer TRIS-HCl pH 8,7; 100 μ moles de NaCN (disuelto en HCl 0,4M) y 0,5 ml de extracto enzimático (aproximadamente 0,05 mg de proteína). La reacción se inició por agregado de NaCN, se incubó a 37 °C durante 30 minutos y se detuvo por agregado de formol 38 % y reactivo férrico ($(\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 0,25 M en HNO_3 20 %). Se centrifugó a 600 x g durante 20 minutos y se leyó la absorbancia del sobrenadante a 460 nm. Los valores de tiocianato formado se obtuvieron de curvas de calibración realizadas con NaSCN 0 - 2 mM (Vázquez, 1984).

II.5.7. Láctico deshidrogenasa

Se utilizó el método de Kornberg (1955) para la determinación de la actividad de LDH. El sistema estándar de incubación contenía, en un volumen final de 1 ml: 0,10 mmoles de buffer fosfato de sodio pH 7,4; 1,0 nmol de piruvato de sodio y 0,20 mmoles de NADH; la solución se incubó 5 minutos a 37 °C. La reacción se inició por agregado de 0,5 ml de solución enzimática (aproximadamente 0,03 mg de proteína) y se leyó inmediatamente la desaparición de NADH a 340 nm cada 30 segundos durante 2 minutos.

II.5.8. Glutámico deshidrogenasa

La actividad de GLDH se determinó siguiendo el método descrito por Strecker (1955). La mezcla de incubación contenía, en un volumen final de 1 ml: 1,3 mmoles de buffer fosfato de potasio pH 7,6; 0,10 mmoles de NH_4Cl ; 0,15 mmoles de NADH y 0,5 ml de extracto enzimático (aproximadamente 0,07 mg de proteína); la solución se incubó durante 5 minutos a 37 °C. La reacción se inició por agregado de 0,1 mmoles de α -cetoglutarato; inmediatamente se leyó la desaparición de NADH a 340 nm, cada 30 segundos durante 2 minutos.

II.5.9. Unidad enzimática

Se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de producto o la desaparición de 1 nmol de sustrato en las condiciones estándar de incubación. Para las enzimas LDH y GLDH se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima que produce una disminución de 0,01 unidades de absorbancia a 340 nm en un minuto.

La actividad específica se define como el número de unidades enzimáticas por mg de proteína.

II.6. DETERMINACION DE PROTEINAS

Las proteínas se determinaron por el método de Lowry y col. (1951). Para cuantificar las proteínas de los eluidos de las columnas de Sephadex se usó el método de Warburg y Christian (1941). Cuando se midieron proteínas en presencia de sulfato de amonio se empleó el método de Bradford (1976).

II.7. DETERMINACION DE GRUPOS SULFHIDRILOS TOTALES

Se realizó la determinación de grupos -SH totales de las proteínas purificadas de GR. La determinación se realizó por el método descrito por Habeeb (1972) utilizando el reactivo de Ellman. La proteína (0,12 mg) se disolvió en 6 ml de solución conteniendo dodecil sulfato de sodio (SDS) 2 %, buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8 y EDTA 0,5 mg/ml. A 3 ml de esta solución se le agregó 0,1 ml de solución de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) (4 mg/ml de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 8), se dejó desarrollar el color durante 15 minutos y se leyó la absorbancia a 410 nm contra una solución de proteína en SDS.

El porcentaje de grupos -SH totales se calculó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ grupos -SH} = \frac{A_{410}}{A_{410}^{\text{control}}} \times 100$$

donde A_{410} = absorbancia a 410 nm correspondiente a las enzimas purificadas y tratadas con URO I

A_{410}^{control} = absorbancia a 410 nm correspondiente a las enzimas purificadas y sin tratamiento con URO I

II.8. DETERMINACION DE GRUPOS AMINO LIBRES

Se realizó la determinación de grupos -NH_2 libres de las enzimas purificadas de GR. Para la determinación se utilizó el método de Udenfriend y col. (1972) modificado por Garesse y col. (1979). A una alícuota de 10 μl de enzima (12 μg) se agregaron 200 μl de buffer borato 0,2 M pH 8,5 y se diluyó con agua destilada hasta 1 ml. Inmediatamente se agregaron 100 μl de solución de fluorescamina (4-fenilspiro(furano-2(3H),1'-ftalan)-3,3'-diona) 0,03 % en acetona, se agitó vigorosamente y se diluyó a 2 ml con agua destilada. Se midió la fluorescencia de la solución resultante ($\lambda_{\text{excitación}} = 375 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 475 \text{ nm}$).

El porcentaje de grupos -NH_2 libres se calculó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ grupos } \text{-NH}_2 = \frac{\text{UF}}{\text{UF}_{\text{control}}} \times 100$$

donde UF = unidades de fluorescencia correspondientes a las enzimas purificadas y tratadas con URO I

$\text{UF}_{\text{control}}$ = unidades de fluorescencia correspondientes a las enzimas purificadas y sin tratamiento con URO I

II.9. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA

II.9.1. Preparación de los geles

El procedimiento empleado se basó en el método de Laemmli (1970). La preparación de los geles se realizó a partir de una solución stock que contenía 30 % de acrilamida y 0,8 % de N,N'-metilenbisacrilamida.

El gel de corrida se preparó mezclando 10 ml de la

solución stock con 11,2 ml de TRIS 1 M pH 8,8; 150 μ l de SDS 20 %; 150 μ l de persulfato de amonio 10 % (preparado en el momento); 20 μ l de N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) y agua destilada hasta un volumen final de 30 ml. La solución fue colocada en un sistema de placas de vidrio de 17 cm x 17 cm separadas entre sí 1,5 mm por separadores de acrílico, que previamente fueron selladas con una solución de agar 4 % para evitar pérdidas. Luego de gelificada la primera solución (aproximadamente 25-30 minutos), se colocó encima el gel concentrador que contenía 1,67 ml de solución stock de acrilamida-bisacrilamida; 1,25 ml de TRIS 1 M pH 6,8; 150 μ l de SDS 20 %; 50 μ l de persulfato de amonio 10 %; 5 μ l de TEMED y agua destilada hasta un volumen final de 10 ml. Sobre esta solución se colocó un peine de acrílico para la formación de los espacios destinados a la siembra de las muestras (calles).

II.9.2. Preparación y siembra de las muestras

El buffer para la preparación de las muestras contenía 2 ml de SDS 20 %; 2 ml de glicerol; 16 ml de TRIS 1 M pH 6,8; 50 μ l de azul de bromofenol 0,2 % y agua destilada hasta un volumen final de 50 ml. A 0,1 ml de muestra (100 μ g de proteína) se le agregó 0,1 ml del buffer descrito y se colocó la mezcla a baño María de agua hirviendo durante 5 minutos. Una vez frío, se sembró 0,1 ml de solución en cada calle del gel y se cubrió con el mismo buffer.

II.9.3. Desarrollo de las electroforesis

El sistema de placas de vidrio con las muestras sembradas se colocó en la cuba electroforética y se agregaron los buffers de los electrodos, cuya composición fue la siguiente:

- Electrodo superior (negativo): TRIS 0,025 M; glicina 0,384 M y SDS 0,03 %; pH final 8,3.

- Electrodo inferior (positivo): TRIS 0,025 M y glicina 0,384 M; pH final 8,3

La cuba se conectó a una fuente de poder y se desarrolló la electroforesis a 3 mA/calle hasta que el frente de corrida llegó a 1 cm del borde inferior de la placa.

II.9.4. Revelado de los geles

Una vez completada la corrida electroforética se desarmó el sistema de placas de vidrio y se colocó el gel en una solución conteniendo 0,05 % de coomassie brilliant blue, 25 % de isopropanol y 10 % de ácido acético, y se dejó coloreando toda la noche. Luego se decoloró el gel en una solución de metanol 45 %-ácido acético 10 % hasta que fueron visibles las bandas de proteína.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I

ACCION FOTODINAMICA Y NO FOTODINAMICA DE LAS PORFIRINAS

	Página
I.1. Acción de URO I sobre la actividad de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D en distintas condiciones experimentales	77
I.1.1. Efecto de concentraciones crecientes de URO I	79
I.1.2. Efecto de la temperatura	81
I.1.3. Efecto del tiempo de exposición	83
I.1.4. Efecto de la anaerobiosis	83
I.1.5. Protección por sustrato	85
I.1.6. Efecto de distintas porfirinas	86
I.2. Efecto de URO I sobre otras enzimas	91
I.2.1. ALA-S	92
I.2.2. Suc.CoA-S	94
I.2.3. Rodenasa	95
I.2.4. LDH	96
I.2.5. GLDH	97
I.3. Conclusiones	98

I. ACCION FOTODINAMICA Y NO FOTODINAMICA DE LAS PORFIRINAS

A principios de siglo se descubrió que los colorantes de acridina sensibilizaban a diversos microorganismos de modo que éstos eran inactivados por la luz visible (Raab, 1900). Más tarde se encontró que no sólo microorganismos, sino también células y biomoléculas podían ser inactivadas de esta forma, demostrándose que un gran número de compuestos tenían propiedades fotosensibilizantes. Este fenómeno se denominó fotosensibilización o acción fotodinámica. La inactivación requería la presencia de oxígeno y, obviamente, era mediada por la fotooxidación de biomoléculas (Moan y col., 1979).

La acción fotodinámica es importante en la investigación clínica y bioquímica, entre otras razones, porque:

- a) En humanos, la fotosensibilización puede ser causada por una gran variedad de drogas, compuestos aromáticos que se encuentran en la atmósfera debido a la polución, o disturbios metabólicos que producen la acumulación de metabolitos fotosensibilizantes en la piel.
- b) Conociendo los mecanismos de acción fotodinámica de algunos compuestos, sería posible aprovechar esta propiedad con propósitos terapéuticos. En este aspecto, se ha propuesto el uso de determinadas sustancias que se unen a las partículas virales para el tratamiento de distintos herpes (Wallis y Melnick, 1965), y se ha aplicado con éxito la terapia fotodinámica (TFD) a distintos tipos de cáncer (Dougherty y col., 1978).

Las porfirinas son eficientes sensibilizadores, por lo cual son muy importantes en fotobiología y fotomedicina. La acumulación de porfirinas en células, como resultado de alteraciones en el metabolismo del hemo o provenientes de la administración en dovenosa de estos pigmentos, conduce a la característica

fotosensibilización de la piel, típica de los pacientes con porfiria cutánea o bajo tratamiento con la TFD.

Sin embargo, hoy se sabe que las porfirinas tienen otros efectos biológicos aparte de su rol fotosensibilizante, como la estimulación de la biosíntesis de colágeno en fibroblastos de piel por URO I (Varigos y col., 1982). la activación de guanilato ciclasa por PROTO (Ignarro y col., 1982), y el efecto potenciador de la hematorporfirina sobre la oxidación de NADPH catalizada por la peroxidasa de rábano, en oscuridad (Bodaness, 1984; van Steveninck y col., 1987).

En la mayoría de los trabajos se estudia el efecto de las porfirinas sobre proteínas de membrana celular (de Goeij y col., 1975; Girotti, 1976; Dubbelman y col., 1978, 1980; Verweij y col., 1981; Sandberg y Brun, 1982; van Steveninck y col., 1985), y existen algunas investigaciones sobre la fotoinactivación de enzimas, como succinato deshidrogenasa y piruvato quinasa (Hilf y col., 1984), ferroquelatasa (Daily y Smith, 1984), glutation reductasa (Aft y Mueller, 1985) por acción de distintas porfirinas, pero muy poco se sabe sobre el efecto de los tetrapirroles en la oscuridad. Por este motivo se comenzó el estudio del efecto de URO I sobre la actividad de enzimas del camino metabólico del hemo y de otros caminos metabólicos, en ambas condiciones lumínicas: luz y oscuridad.

I.1. ACCION DE URO I SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALA-D, PBGasa, DEAMINASA Y URO-D EN DISTINTAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Dado que la mayoría de los estudios se realizaron durante 2 horas a 37 °C en oscuridad o bajo luz UV, se decidió investigar previamente el efecto de estas condiciones sobre la actividad de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D.

No se observaron variaciones significativas en las

actividades de las enzimas mantenidas en dichas condiciones respecto de los controles conservados durante 2 horas a 4 °C (Tabla I.1.).

TABLA I.1.: Efecto del tratamiento en oscuridad o bajo luz UV sobre la actividad enzimática

ENZIMA	ACTIVIDAD (U/ml)		
	Control	Oscuridad	Luz UV
ALA-D (n = 15)	0,97 ± 0,05	0,94 ± 0,04	0,92 ± 0,06
PBGasa (n = 15)	16,46 ± 1,02	16,85 ± 1,17	15,92 ± 2,09
Deaminasa (n = 15)	40,31 ± 1,09	40,52 ± 1,43	40,05 ± 1,97
URO-D (n = 20)	16,61 ± 1,15	15,99 ± 1,54	15,59 ± 2,20

Los hemolizados de GR fueron mantenidos durante 2 horas a 37 °C en oscuridad o bajo luz UV, sin otro tratamiento. Los controles se mantuvieron durante 2 horas a 4 °C. Los valores representan el promedio ± DS. n = número de experiencias realizadas por duplicado. Otros detalles experimentales se indican en Materiales y Métodos.

I.1.1. Efecto de concentraciones crecientes de URO I

Manteniendo constante la temperatura y el tiempo, se estudió el efecto de distintas concentraciones de URO I sobre las actividades enzimáticas (Figura I.1.). URO I produjo una significativa disminución en la actividad de las cuatro enzimas, tanto en luz como en oscuridad; este efecto fue dependiente de la concentración de porfirina y en todos los casos la inactivación total fue mayor en la luz que en la oscuridad, sugiriendo la existencia de dos tipos de inactivación, uno dependiente y otro independiente de la luz.

Lim y Gigli (1981) observaron una disminución de la actividad del componente C5 del complemento sérico de cobayo por tratamiento con altas concentraciones de PROTO IX en oscuridad. Nuestros hallazgos apoyarían así la existencia de otro efecto biológico de las porfirinas independiente de la luz.

Es de notar que con una concentración de URO I 10 μ M, la fotoinactivación de ALA-D, PBGasa y deaminasa supera el 50 % (Figura I.1. A, B, C), mientras que URO-D sólo alcanza una inactivación similar con una concentración de URO I 10 veces mayor (Figura I.1. D). La fotoinactivación de enzimas es un fenómeno conocido que puede producirse por la fotooxidación de aminoácidos esenciales seguida o no por un entrecruzamiento ("cross-linking") secundario de la proteína (de Goeij y col., 1975; Girotti, 1976; Dubbelman y col., 1978, 1980 b; Verweij y col., 1981; Verweij y van Steveninck, 1982; Vincent y col., 1986a). La inhibición no foto dinámica podría deberse a la unión de la porfirina al o cerca del sitio activo, causando un cambio conformacional en la proteína con reducción de su actividad enzimática. La alta concentración de URO I requerida para inactivar a la URO-D sugiere que esta enzima tiene una conformación proteica menos flexible, que la haría más resistente a los cambios químicos inducidos por la porfirina.

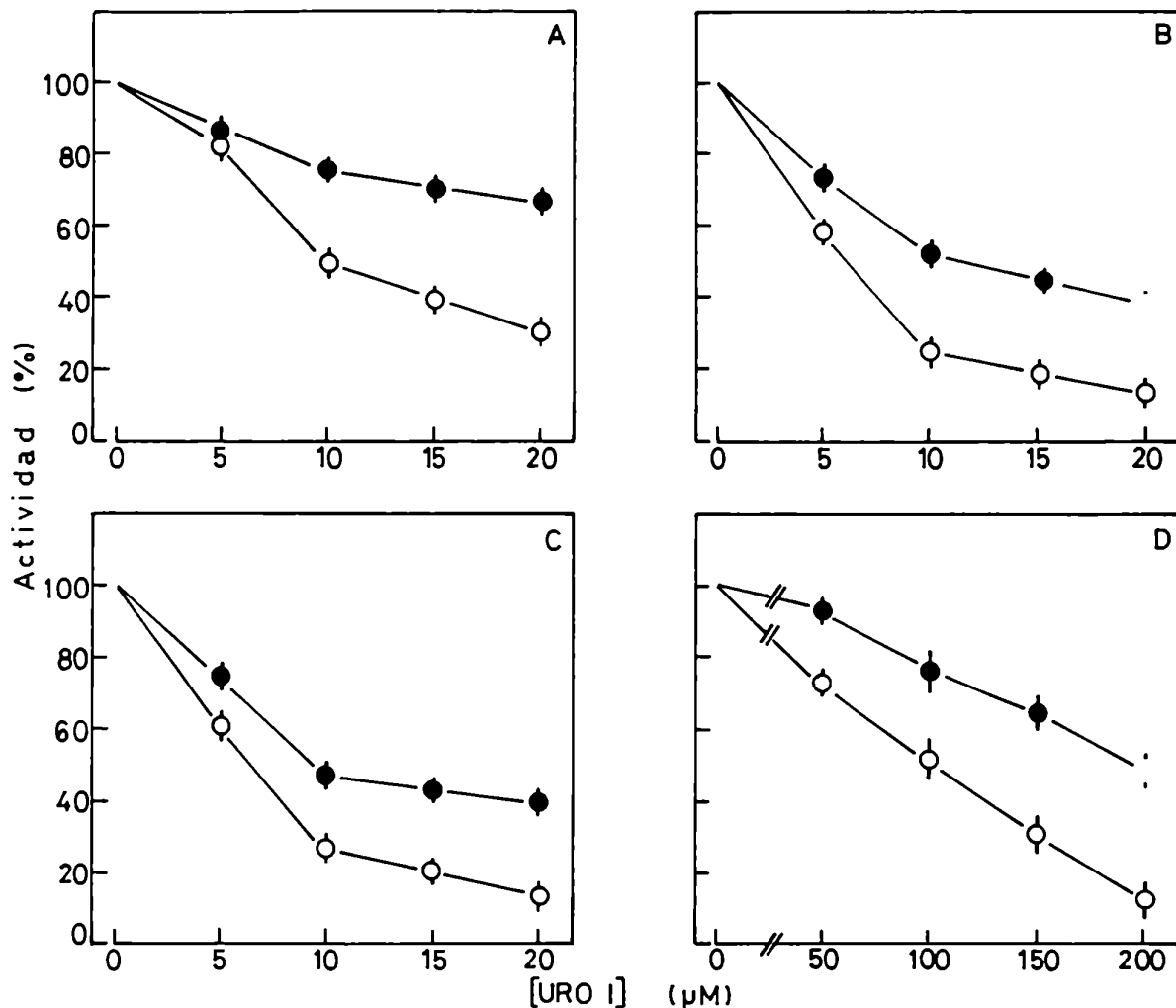


FIGURA I.1.: Efecto de URO I sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D). Los hemolizados de GR se trataron con URO I en oscuridad (●) o bajo luz UV (○), durante 2 horas a 37 °C. Los valores presentados son el promedio \pm DS de los datos obtenidos en 3 experiencias realizadas por duplicado, y se expresan como porcentaje de los valores control correspondientes a cada experiencia. Valores control: ALA-D: $0,028 \pm 0,002$ (n = 15); PBGasa: $0,470 \pm 0,029$ (n = 15); deaminasa: $1,152 \pm 0,031$ (n = 15); URO-D: $0,060 \pm 0,004$ (n = 20). n = número de determinaciones realizadas. Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

I.1.2. Efecto de la temperatura

Se determinaron las actividades enzimáticas luego de mantener los hemolizados de GR a distintas temperaturas durante 2 horas en oscuridad o bajo luz UV, y en presencia de concentraciones fijas de URO I (10 μ M para ALA-D, PBGasa y deaminasa; 100 μ M para URO-D).

Se puede ver en la Figura I.2. que la inactivación foto-dinámica de las cuatro enzimas aumenta con la temperatura y, en el caso de PBGasa y deaminasa, es superior al 40 % aun a 0 °C (Figura I.2. B, C). En oscuridad, las actividades enzimáticas descienden lentamente con el aumento de la temperatura, llegando a un 30 - 40 % de inactivación recién a los 45 °C.

La fotooxidación de proteínas es una reacción independiente de la temperatura, mientras que el "cross-linking" interpeptídico es significativamente menor a bajas temperaturas que a altas temperaturas (van Steveninck y col., 1983). Los resultados obtenidos en iluminación sugerirían nuevamente que la presencia de URO I causa la fotooxidación de aminoácidos esenciales para la actividad de las enzimas, como efecto primario y luego ocurriría el "cross-linking" inter o intrapeptídico como una reacción secundaria.

En oscuridad, la inactivación enzimática sería el resultado de cambios conformacionales inducidos en las enzimas por unión de la porfirina a la proteína, efecto que sería independiente de la temperatura. Sin embargo, se sabe que puede ocurrir "cross-linking" interpeptídico en oscuridad, y que esta reacción transcurre muy lentamente a bajas temperaturas y más rápidamente a altas temperaturas (Dubbelman y col., 1980 b; van Steveninck y col., 1983). Dado el perfil de las curvas de actividad en función de la temperatura en oscuridad, no se puede descartar que a partir de los 30 °C ocurra también "cross-linking" inter o intrapeptídico, además de la inhibición directa de las enzimas debida a la unión de URO I.

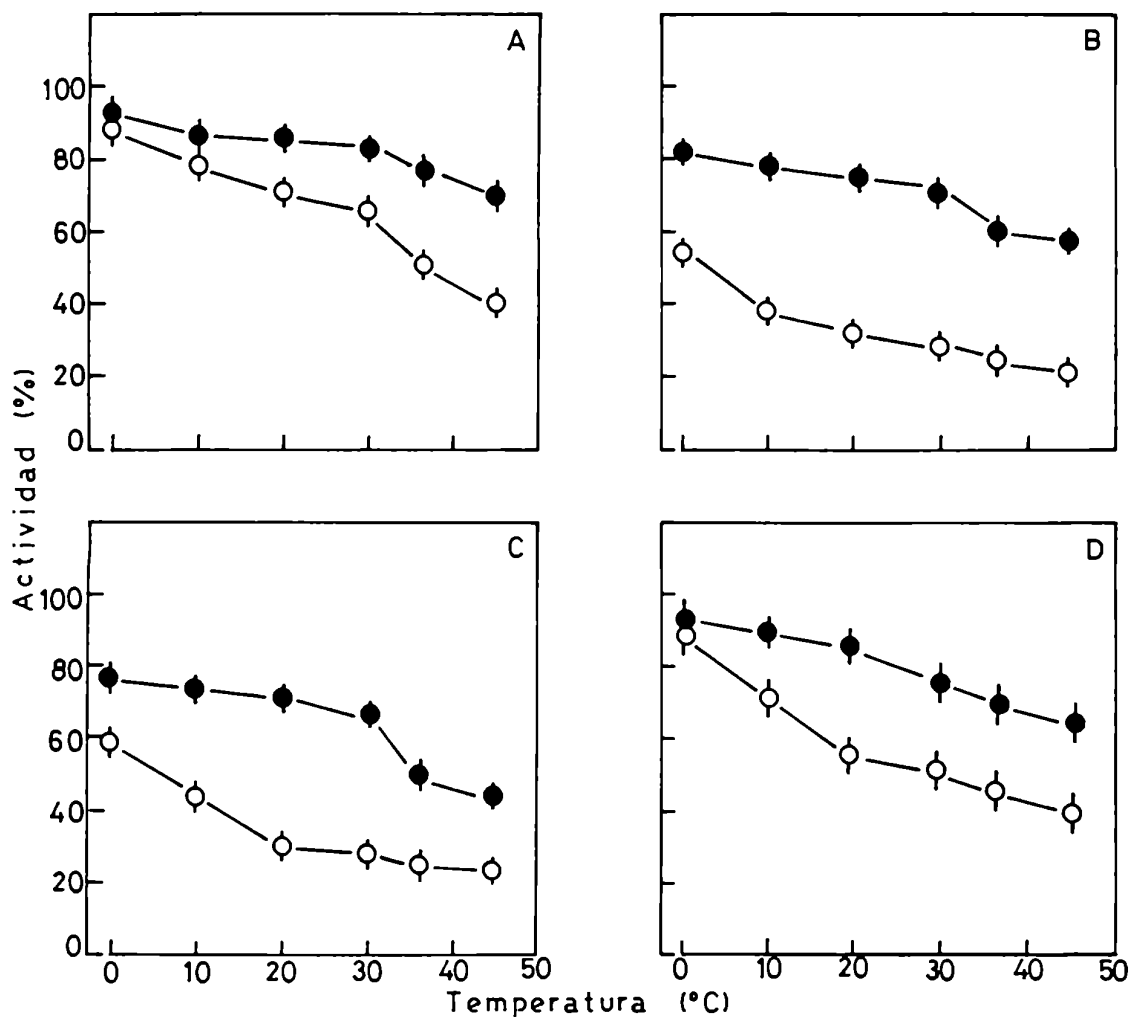


FIGURA I.2.: Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D). Los hemolizados de GR fueron tratados con URO I $10 \mu\text{M}$ (A, B y C) ó $100 \mu\text{M}$ (D), durante 2 horas en oscuridad (●) o bajo luz UV (○), a 0, 10, 20, 30, 37 y 45 °C. Los detalles experimentales y valores controles se indican en la leyenda de la Figura I.1.

I.1.3. Efecto del tiempo de exposición

Usando las mismas concentraciones de URO I antes indicadas y manteniendo la temperatura constante a 37 °C, se midieron las actividades enzimáticas luego de distintos tiempos de exposición a la porfirina.

La inactivación enzimática aumenta con el tiempo de exposición y, nuevamente, es mayor en luz que en oscuridad (Figura I.3.). PBGasa y deaminasa sufren una fotoinactivación del 40 % ya a los 30 minutos (Figura I.3. B, C), y las cuatro enzimas muestran una actividad remanente del 30 % o menos a las 3 horas de iluminación en presencia de URO I.

Los resultados obtenidos estarían de acuerdo con los descritos por Vincent y col. (1986 b), quienes encontraron que la irradiación con luz UV de una mezcla de hemoproteína y PROTO resultaba en la rápida fotodescomposición de la proteína, la cual aumentaba con el tiempo de exposición. El mecanismo propuesto justificaría este efecto, que se debería a un aumento de captación de la porfirina por las enzimas en función del tiempo.

I.1.4. Efecto de la anaerobiosis

Si la inactivación enzimática inducida por URO I se produce por reacciones fotooxidativas, éstas deberán tener un requerimiento absoluto de oxígeno. Por lo tanto, resultó de interés estudiar el efecto de la porfirina en anaerobiosis.

En la Figura I.4. se puede ver que la fotoinactivación en anaerobiosis es mucho menor que en aerobiosis, y es similar a la inactivación en oscuridad producida en presencia o ausencia de oxígeno. Estos resultados sugieren que efectivamente el mecanismo de acción de URO I en iluminación estaría mediado por especies reactivas de oxígeno. El efecto de URO I en oscuridad se debería, como ya lo hemos propuesto, a la unión de la porfirina a la proteína, unión que no se vería afectada por la presencia de oxígeno.

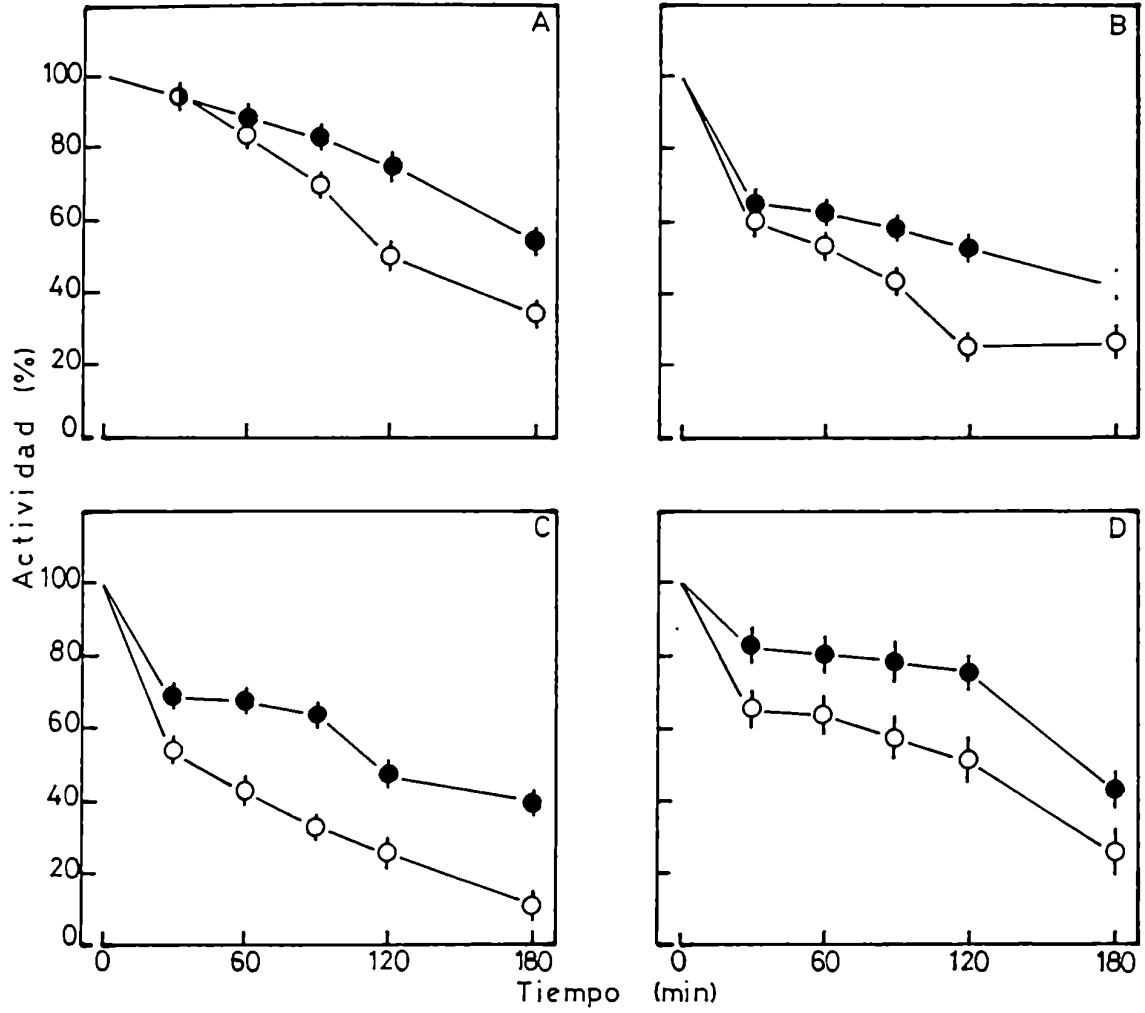


FIGURA 1.3.: Efecto del tiempo de contacto de URO I sobre la actividad de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D). Los hemolizados de GR fueron tratados con URO I 10 μ M (A, B y C) ó 100 μ M (D), en oscuridad (●) o bajo luz UV (○) a 37 °C durante 30, 60, 90, 120 y 180 minutos. Los detalles experimentales y valores controles se indican en la leyenda de la Figura 1.1.

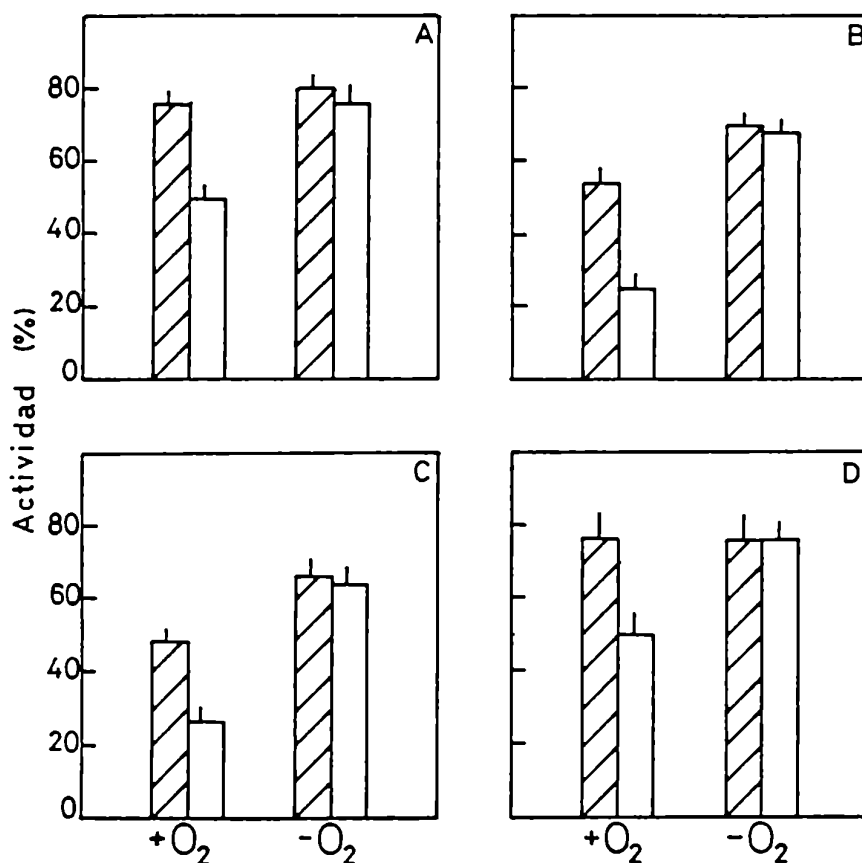


FIGURA I.4.: Efecto de la anaerobiosis sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D).

Los hemolizados de GR se trataron con URO I 10 μ M (A, B y C) ó 100 μ M (D), en oscuridad (▨) o bajo luz UV (□), durante 2 horas a 37 °C, en condiciones de aerobiosis o de anaerobiosis. Otros detalles experimentales se detallan en la leyenda de la Figura I.1.

I.1.5. Protección por sustrato

Se ha observado que la preincubación con ALA protege al ALA-D de la inactivación producida por modificación de los

residuos histidina esenciales (Fukuda y col., 1988, 1990). Se sabe también que la preincubación con PBG ejerce un 80 - 100 % de protección frente a la inactivación de PBGasa por el calentamiento (Llambías y Batlle, 1971 a; Sancovich y col., 1976).

Para establecer si existe protección de las enzimas frente a la inactivación producida por URO I, se preincubaron los hemolizados de GR durante 30 minutos a 0 °C con ALA (5 mM) o PBG (0,1 mM) y luego se mantuvieron 2 horas a 37 °C en oscuridad o bajo luz UV, en presencia de URO I 10 µM.

La Figura I.5. A muestra una notable protección de la actividad de ALA-D por la presencia de su sustrato. También el PBG ejerce igual acción sobre PBGasa (Figura I.5. B) y deaminasa (Figura I.5. C) aunque en menor grado. Estos resultados estarían así apoyando el mecanismo propuesto, ya que los sustratos protegerían el sitio activo de las enzimas, impidiendo o dificultando la entrada de la porfirina y la posterior oxidación de sus aminoácidos esenciales.

Este estudio no se pudo realizar con URO-D por cuanto su sustrato es el uroporfirinógeno, es decir, la forma reducida de la URO. Para que el porfirinógeno permanezca reducido es necesario mantener el sistema en anaerobiosis, y ya demostramos que en estas condiciones la URO I no afecta la actividad enzimática (ítem I.1.4.).

I.1.6. Efecto de distintas porfirinas

En 1926, Harris observó que las proteínas séricas eran fotooxidadas en presencia de hematoporfirina (HP). En el mismo año, Gaffron demostró que esta fotooxidación se producía también en presencia de clorofila, y que la HP sensibilizaba además la fotooxidación de caseína. Se encontró que las proteínas séricas eran fotooxidadas por distintas porfirinas con el siguiente orden de eficiencia: URO > MESO > COPRO; Zn-HP y HP libre de metales

exhibían una acción similar, mientras que hemina, Cu-HP y Ag-HP no tenían efecto (Spikes, 1975). Sandberg y Romslo (1981) también encontraron que la succinato deshidrogenasa era inactivada por irradiación en presencia de iguales concentraciones de distintas porfirinas, y el fotodaño disminuía en el orden: PROTO > URO-octa metiléster > URO; en cambio el efecto sobre GLDH seguía un orden inverso.

Teniendo en cuenta que la mayoría de estos trabajos se refieren al efecto de los tetrapirroles en presencia de la luz, se estudió el efecto de distintas porfirinas sobre la actividad de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D eritrocitarias expuestas a la luz UV y también en oscuridad (Figura I.6.).

Es sabido que la eficiencia de las porfirinas para inducir la fotooxidación de aminoácidos depende de la naturaleza de los sustituyentes laterales (Spikes, 1975; Sandberg y Romslo, 1981). Sin embargo, de los resultados aquí obtenidos (Figura I.6.) podríamos concluir que, además de la naturaleza de las cadenas laterales, tiene importancia su distribución en el anillo porfirínico, en base a los efectos diferentes producidos por los isómeros de tipo I y III de las porfirinas.

La fotoinactivación de ALA-D provocada por PROTO IX es similar a la ejercida por URO I (Figura I.6. A). Se ha sugerido que el daño fotodinámico depende no sólo del tipo de porfirina si no también del ambiente en que ésta actúa, siendo así la PROTO más efectiva en ambientes hidrofóbicos (Sandberg y Romslo, 1981). El fuerte efecto fotoinactivante de PROTO IX sobre ALA-D podría deberse entonces a la naturaleza hidrofóbica de su sitio activo, lo cual estaría de acuerdo con el mecanismo de acción postulado para esta enzima (Batlle y Stella, 1978). En oscuridad, sólo URO I redujo significativamente la actividad de ALA-D (aproximadamente un 30 %), mientras que las restantes porfirinas prácticamente no alteraron la actividad de esta enzima (Figura I.6. A).

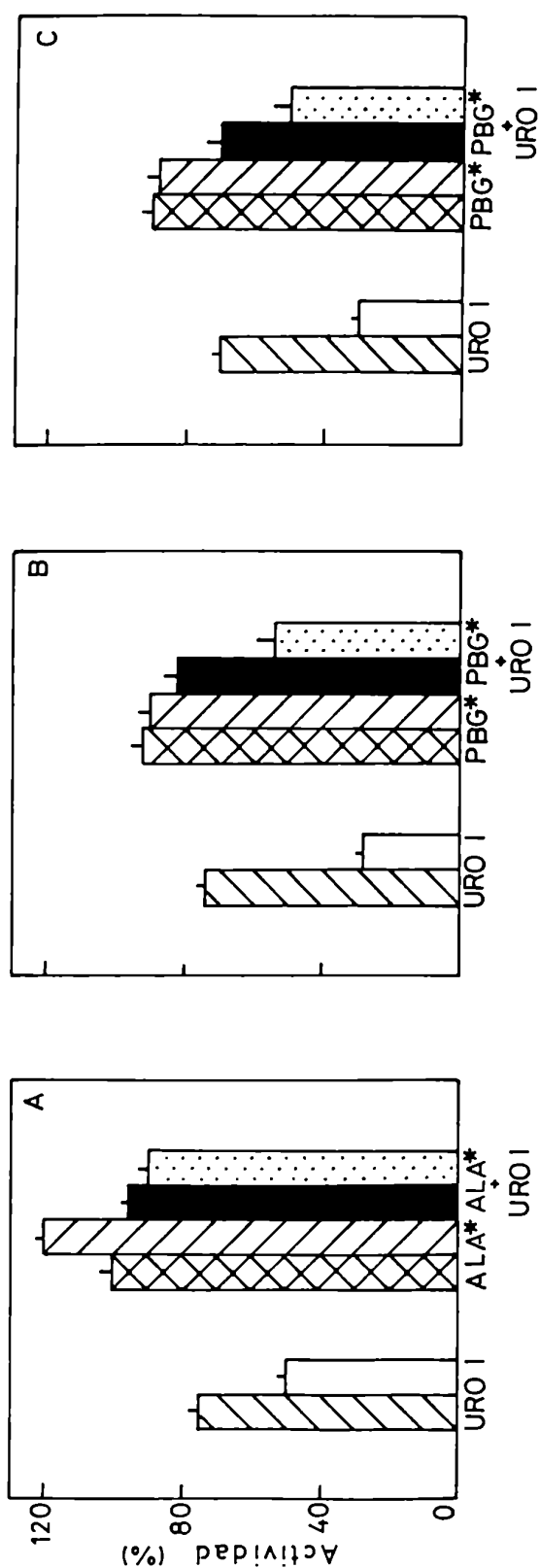


FIGURA 1.5.: Efecto de la presencia de sustrato sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B) y deaminasa (C). Los hemolizados de GR se preincubaron (*) durante 30 minutos a 0 °C en presencia de ALA (5 mM) (A) o PBG (0,1 mM) (B y C), luego se mantuvieron 2 horas a 37 °C en oscuridad (▨), o bajo luz UV (■) y sin (▩) y con (▧, ▨) y sin (▩, ▨) agregado de URO I 10 μM. (▧, ▨) Hemolizados de GR tratados con URO I 10 μM en oscuridad o bajo luz UV, respectivamente, durante 2 horas a 37 °C. Los detalles experimentales y valores controles se indican en la leyenda de la Figura 1.5.

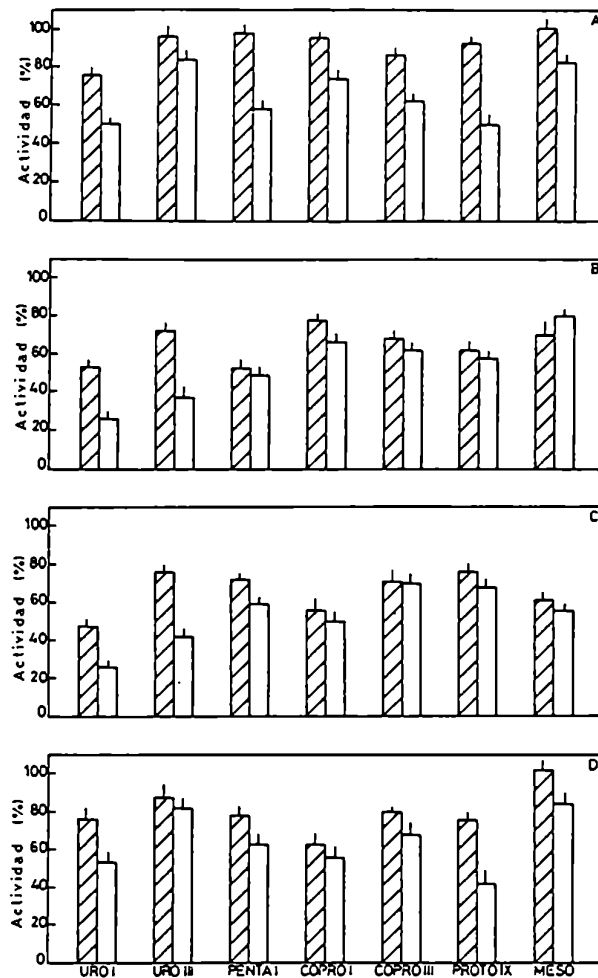


FIGURA I.6.: Efecto de distintas porfirinas sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D). Los hemolizados de GR se trataron con una concentración final de 10 μ M (A, B y C) ó 100 μ M (D) de las distintas porfirinas durante 2 horas a 37 °C en oscuridad (▨) o bajo luz UV (□). Los detalles experimentales y valores controles se indican en la leyenda de la Figura I.1.

Todas las porfirinas ensayadas produjeron inactivación de PBGasa y deaminasa, tanto en oscuridad como bajo luz UV (Figura I.6. B y C). URO I y URO III redujeron notablemente la actividad de estas enzimas (50 % en oscuridad, 75 % en iluminación); en cambio PROTO IX produjo una inhibición mucho menor, lo que sugeriría que el ambiente del sitio activo es de naturaleza hidrofílica.

El mayor efecto inactivante sobre URO-D fue producido por PROTO IX; URO I, PENTA I y COPRO I ejercieron una fotoinactivación ligeramente menor (Figura I.6. D). Estos resultados nuevamente indicarían que la efectividad fotodinámica de las porfirinas depende de la distribución de sus cadenas laterales en los carbonos β del anillo porfirínico, y el gran efecto de PROTO IX sugiere que también el centro activo de la URO-D es de naturaleza hidrofóbica. En este estudio se usaron concentraciones de 100 μM de todas las porfirinas, con las cuales se alcanzó una fotoinactivación de por lo menos 15 %. El hecho de requerir una concentración de porfirinas 10 veces superior nos vuelve a indicar que la estructura proteica del sitio activo de la URO-D es menos flexible que la del ALA-D, PBGasa y deaminasa.

Diversos estudios han demostrado que las cadenas laterales de varios aminoácidos, como histidina, metionina, cistina, cisteína, tirosina y triptofano, son sustratos potenciales para el último paso de las reacciones oxidativas fotosensibilizadas por pigmentos (Ray, 1967). Se ha establecido la presencia de residuos histidina en el sitio activo de ALA-D (Fukuda y col., 1988) y de URO-D (Koopmann y Battle, 1987), y de residuos triptofano (Frydman y Frydman, 1973), cisteína y tirosina (Miller y col., 1988) en el sitio activo de deaminasa, de modo que la fotooxidación inducida por porfirinas de estos aminoácidos, esenciales para la actividad enzimática, explicaría la fotoinactivación de las enzimas estudiadas, mientras que el efecto observado en oscuridad, como ya lo hemos indicado, podría ser la consecuencia de cambios

conformacionales producidos en o cerca del sitio activo debidos a la unión de las porfirinas a la proteína.

I.2. EFEECTO DE URO I SOBRE OTRAS ENZIMAS

Si bien se ha propuesto que el fotodaño tisular producido por las porfirinas en pacientes porfíricos o sometidos a TFD se debe a la peroxidación lipídica (Bachowski y col., 1988; Hirsch, 1989; Girotti, 1990), numerosos estudios han mostrado que los tetrapirroles y compuestos derivados pueden causar la fotoinactivación *in vitro* de diversas proteínas, incluyendo el citocromo P₄₅₀ microsomal (Bickers y col., 1982; Dixit y col., 1983; Vincent y col., 1986 b). La actividad de lisozima de huevo de gallina disminuyó rápidamente cuando fue iluminada en presencia de HP (Jori y col., 1969); esta porfirina también fotoinactivó la alcohol deshidrogenasa de levadura (Della Pietra y Dose, 1965) y la ribonucleasa A (Jori y col., 1970). Los derivados de HP tuvieron actividad fotosensibilizante variable sobre algunas enzimas de mitocondria y citosol de células de adenocarcinoma mamario de rata, como succinato deshidrogenasa, citocromo c oxidasa, piruvato quinasa, LDH y glucosa fosfato isomerasa (Hilf y col., 1984). La incubación de glutatión reductasa de levadura en presencia de hemina produjo la rápida destrucción de su actividad enzimática (Aft y Mueller, 1985). La irradiación en presencia de URO o PROTO produjo la inactivación de succinato deshidrogenasa y GLDH de mitocondrias sonificadas de hígado de rata (Sandberg y Romslo, 1980, 1981) y la presencia de PROTO causó la fotoinactivación de succinato deshidrogenasa, GLDH, LDH y fosfatasa ácida de neutrófilos humanos en cultivo (Sandberg y col., 1981).

Con el objeto de establecer si los efectos anteriormente descritos eran más generales, se estudió la acción de la URO I sobre enzimas citoplasmáticas y mitocondriales tales como ALA-S, Succ.CoA-S, rodenasa, LDH y GLDH mantenidas en oscuridad o bajo

luz UV, en presencia de esta porfirina.

I.2.1. ALA-S

Para la determinación de ALA-S se utilizó un homogenato crudo de hígado de ratón. Dada la corta vida media de esta enzima, se mantuvo sólo 30 minutos a 30 °C en presencia o no de URO I 10 µM, en oscuridad o bajo luz UV.

La actividad enzimática se comparó con la de una alícuota del mismo homogenato, mantenida en oscuridad a 4 °C por el mismo período de tiempo, a la que se le asignó el valor de 100 %.

En oscuridad, a 30 °C, la enzima redujo sólo un 10 % de su actividad, mientras que en iluminación o en oscuridad en presencia de URO I, perdió un 70 % (Figura I.7.). La irradiación en presencia de la porfirina causó una pérdida aún mayor de la actividad de ALA-S.

El ALA-S posee un residuo lisina en su sitio catalítico al cual se une el cofactor fosfato de piridoxal dando ε-amino-fosfopiridoxil-lisina (Nandi, 1978). Kobayashi y Makino (1970) han demostrado la formación de bases de Schiff entre el fosfato de piridoxal y el buffer TRIS. Se comprobó que la formación de aductos es máxima a pH 8,2 aunque ocurre entre pH 6 y 10 (Mittra y Metzler, 1988). Estos estudios se realizaron en condiciones de temperatura e iluminación ambiental, y no hay datos en oscuridad o en presencia de alta energía lumínica. Teniendo en cuenta que la enzima fue resuspendida en buffer TRIS 0,05 M pH 7,4; podemos suponer que en oscuridad, la formación de aductos es mínima, provocando probablemente un leve descenso en la cantidad de cofactor disponible que no se refleja en una inactivación del ALA-S. Sin embargo, cuando la enzima se ilumina con luz UV, de alta energía, podría estar más favorecida la formación de bases de Schiff entre el fosfato de piridoxal y el TRIS, lo cual conduciría a una fuerte inactivación del ALA-S.

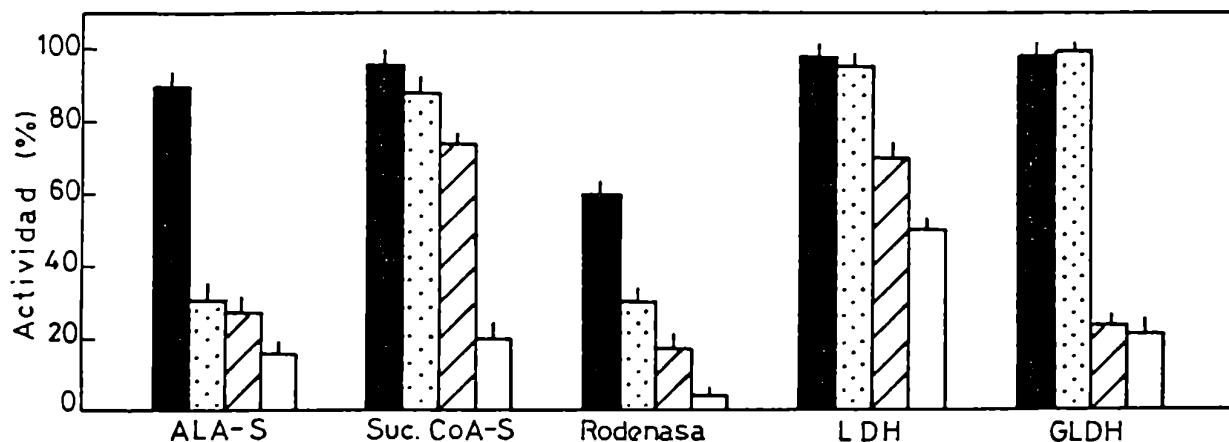


FIGURA I.7.: Efecto de URO I sobre la actividad enzimática de ALA-S, Succ.CoA-S, rodenasa, LDH y GLDH. Las enzimas se mantuvieron en oscuridad (■, ▨) o bajo luz UV (▤, □), en presencia (▨, ▤) o ausencia (■, ▤) de URO I 10 μ M, durante 30 minutos a 30 °C (ALA-S y rodenasa) o 2 horas a 37 °C (Succ.CoA-S, LDH y GLD). Valores control: ALA-S: $(2,530 \pm 0,708) \times 10^{-3}$ (n = 5); Succ.CoA-S: $0,030 \pm 0,002$ (n = 5); rodenasa: $120,2 \pm 8,4$ (n = 5); LDH: 910 ± 82 (n = 5); GLDH: 1241 ± 47 (n = 5). Otros detalles experimentales se indican en la leyenda de la Figura I.1.

La unión de URO I, que a pH neutro se encuentra como carboxilato, a la lisina, aminoácido básico, impidiendo así la unión del cofactor, explicaría la pérdida de actividad enzimática observada en oscuridad en presencia de la porfirina.

La enzima posee, además, un grupo -SH en su sitio activo que cumple un rol primario en la regulación de su actividad (Scholnick y col., 1972 a); este grupo también estaría involucrado en la unión del fosfato de piridoxal a la enzima, y su oxidación resulta en la inhibición total de la actividad enzimática (Scholnick y col., 1972 b). La oxidación del grupo -SH fotodinámicamente inducida por URO I sería la causa de la mayor inactivación observada bajo luz UV en presencia de la porfirina.

I.2.2. Suc.CoA-S

La Suc.CoA-S es una enzima de vida media relativamente larga por lo cual se decidió emplear una fracción parcialmente purificada obtenida de *Rp. spheroides*. La enzima retuvo su actividad original cuando se la mantuvo 2 horas a 37 °C en oscuridad o bajo luz UV (Figura I.7.). La presencia de URO I 10 µM redujo ligeramente la actividad de Suc.CoA-S (aproximadamente 25 %) en tanto que la irradiación en presencia de la porfirina produjo una fuerte inactivación del orden del 80 % (Figura I.7.).

Recordemos que la Suc.CoA-S cataliza la siguiente reacción (Reacción I.1.):



Reacción I.1.

La enzima bacteriana es un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ (Bridger, 1971); el sitio activo se encuentra en el punto de contacto entre las subunidades α y β (Bridger y col., 1968; Collier y Nishimura, 1978; Vogel y Bridger, 1983). Se sabe que casi todo el triptofano de la enzima se encuentra en la subunidad β y que al menos uno de sus residuos, ubicado muy próximo al sitio de unión de la CoA, actúa como grupo "señal" para la entrada de los sustratos (Prasad y col., 1983). Se ha demostrado que la modificación de uno de los restos triptofano de la subunidad β no altera la fosforilación por ATP, pero impide las reacciones siguientes y, en consecuencia, la formación del producto final (Nishimura, 1986). Cerca o en este mismo sitio de unión de la CoA, se ha detectado la presencia de grupos -SH sobre la subunidad β , en estrecho contacto con grupos similares sobre la subunidad α (Collier y Nishimura, 1978). Estos grupos pueden formar puentes disulfuro por fotooxidación, que impedirían la correcta alineación de las cadenas laterales de

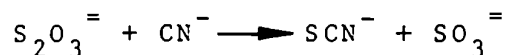
aminoácidos necesaria para que ocurra la reacción enzimática (Prasad y col., 1983). El mecanismo de la reacción involucra un intermediario E-P y el sitio de fosforilación es un residuo histidina de la subunidad α (Bridger, 1971).

La alteración del residuo triptofano de la subunidad β y/o del residuo histidina de la subunidad α explicaría la pérdida de actividad de la enzima en presencia de URO I y la fotooxidación de estos aminoácidos y/o de los grupos -SH sería responsable de la mayor inactivación producida en presencia de luz UV (Figura I.7.).

I.2.3. Rodenasa

La rodenasa es una enzima inestable que en general pierde su actividad rápidamente. Por este motivo, la enzima purificada se trató sólo durante 30 minutos a 30 °C, en presencia o ausencia de URO I 10 μ M (Figura I.7.). En ausencia de porfirina y en oscuridad, la rodenasa perdió el 40 % de su actividad con respecto al control y luego de la irradiación con luz UV decayó al 30 % de su nivel original. Buzaleh (1988) ha observado que la preincubación de rodenasa durante 30 minutos a 37 °C, en ausencia de sus sustratos, produce una reducción del 56 % de la actividad enzimática respecto de los controles no preincubados; esta pérdida de actividad fue atribuida a una desnaturalización parcial de la proteína. El tratamiento con URO I afectó aún más a la enzima, provocando un 82 % de inhibición en oscuridad y un 95 % de inactivación en presencia de luz UV.

La rodenasa cataliza la siguiente reacción (Reacción I.2.):



Reacción I.2.

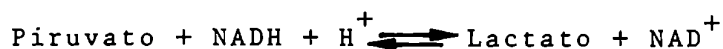
A partir de estudios químicos y cristalográficos se ha determinado que la enzima tiene un sitio de unión catiónico (Mintel y Westley, 1966) y uno hidrofóbico (Horowitz y Westley, 1970), y que contiene 4 grupos cisteína de los cuales la cisteína-247 ha sido identificada como el sitio de unión covalente del átomo sulfano en la enzima azufre-sustituída (Blumenthal y Heinrikson, 1972). Se ha encontrado que la modificación de esta cisteína por tratamiento con iodoacetato o fenilglioxal, producía una marcada inactivación de la enzima (Weng y col., 1978). También se ha estudiado el efecto de especies reactivas de oxígeno sobre la actividad, observándose que tanto la enzima libre como la enzima azufre-sustituída eran inactivadas por peróxido de hidrógeno u $\text{OH}\cdot$ debido a la oxidación de grupos $-\text{SH}$ esenciales, con formación de puentes disulfuro intramoleculares (Costa y col., 1977; Canella y Berni, 1983). La inactivación producida por URO I podría deberse a la unión de la porfirina a la proteína, con alteración de los residuos tiólicos; la oxidación de la cisteína-247 explicaría la mayor pérdida de actividad observada en condiciones de iluminación. La fotooxidación podría deberse a la presencia de especies reactivas de oxígeno, como peróxido de hidrógeno u $\text{OH}\cdot$, ya que se ha postulado que estos compuestos serían los mediadores del foto-daño celular inducido por porfirinas (Capítulo III, Introducción).

I.2.4. LDH

La LDH es una enzima sumamente estable; en la Figura I.7. se puede observar que no altera su actividad al permanecer 2 horas a 37 °C en oscuridad o bajo luz UV. Sin embargo, en presencia de URO I 10 μM se inhibió cerca del 30 % en oscuridad y un 50 % en la luz.

Esta enzima es citoplasmática y cataliza la Reacción I.3. En base a estudios cinéticos y a la dependencia con el pH, se ha identificado a un residuo histidina como el grupo dador y aceptor de protones en la reacción enzimática (Laskowski y Scheraga, 1954).

El H^+ generado en la oxidación de lactato por NAD^+ , en presencia de LDH, es aceptado por el grupo imidazol en la superficie de la enzima (Novoa y Schwert, 1961); inversamente, el H^+ requerido para la reducción de piruvato por NADH es provisto por la forma protonada de ese mismo aminoácido (Winer y Schwert, 1958). La alteración de este residuo histidina por la presencia de URO I podría explicar la pérdida de actividad de LDH, mientras que la fotooxidación del aminoácido, inducida por la porfirina sería responsable de la inactivación de la enzima en presencia de la luz.

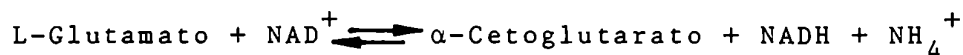


Reacción I.3.

I.2.5. GLDH

La GLDH es también una enzima muy estable; no perdió actividad cuando se la mantuvo 2 horas a 37 °C en oscuridad o bajo luz UV (Figura I.7.). Sin embargo, en presencia de URO I 10 μM , la actividad enzimática se redujo en un 75-80 %, independientemente de las condiciones de iluminación.

Esta enzima es mitocondrial y cataliza la siguiente reacción (Reacción I.4.):



Reacción I.4.

Por estudios de secuenciación e inactivación con fosfato de piridoxal, se identificó un residuo esencial de lisina en su sitio

activo (Smith y col., 1970).

En este caso la pérdida de actividad en presencia de URO I no se debería a una fotooxidación de aminoácidos esenciales ya que el efecto producido en iluminación es de la misma magnitud que el producido en oscuridad. En consecuencia, esta inactivación podría ser el resultado de modificaciones inducidas por unión de la porfirina a la proteína. A pH 7, la URO I se encuentra en forma de carboxilato, por lo que podría esperarse que se uniera a aminoácidos básicos como la lisina que, como dijimos, es uno de los residuos esenciales del sitio activo de esta enzima.

I.3. CONCLUSIONES

- Se estudió el efecto de URO I sobre la actividad de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D. Se encontró inactivación fotodinámica y no fotodinámica de todas las enzimas. En todos los casos la inactivación fue dependiente de la concentración, la temperatura, el tiempo de contacto de las proteínas con la porfirina y la atmósfera aeróbica.
- La presencia de los sustratos protegió la actividad de ALA-D, PBGasa y deaminasa frente a la inactivación producida por URO I.
- Se estudió el efecto de diversas porfirinas sobre la actividad de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D. Todas las porfirinas produjeron distintos grados de inactivación de las enzimas. Se comprobó que además de la naturaleza de las cadenas laterales sustituyentes, es importante para la eficiencia fotoinactivante su distribución en el anillo porfirínico, por cuanto los isómeros de posición de una misma porfirina produjeron efectos diferentes.
- De acuerdo a los resultados obtenidos, se postula que la fotoinactivación enzimática de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D estaría mediada por especies reactivas de oxígeno, que la oxidación inducida por porfirinas de aminoácidos esenciales del sitio

activo sería la causa primaria de la fotoinactivación y que luego ocurriría un entrecruzamiento inter y/o intrapeptídico como reacción secundaria. El efecto observado en oscuridad podría deberse a cambios conformacionales en o cerca del sitio activo de las enzimas, debidos a la unión de la porfirina a la proteína.

- Se estudió el efecto de URO I sobre otras enzimas citoplasmáticas y mitocondriales. En todos los casos se encontró una marcada inhibición de las actividades enzimáticas. Dicha inactivación se debería también a la fotooxidación de aminoácidos esenciales del sitio activo en el caso de ALA-S, Succ.CoA-S, rodenasa y LDH, mientras que para la GLDH, la inhibición parecería ser el resultado de modificaciones producidas por unión de la porfirina a la proteína a pH neutro.

CAPITULO II

EFFECTO DE DISTINTOS FOTSENSIBILIZADORES SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALA-D, PBGasa, DEAMINASA Y URO-D

	Página
II.1. Luminol	101
II.2. Riboflavina	104
II.3. Rosa de Bengala y azul de metileno	105
II.4. URO I y luz blanca	110
II.5. Conclusiones	110

II. EFEECTO DE DISTINTOS FOTOSENSIBILIZADORES SOBRE LA ACTIVIDAD DE ALA-D, PBGasa, DEAMINASA Y URO-D

En general, las enzimas no son inactivadas por la irradiación con luz UV o visible, ya que la mayoría de las proteínas no absorben estas radiaciones en mayor grado (Glad y Spikes, 1966). Cuando la energía lumínica es absorbida por un cromóforo y luego transferida a otra molécula que por sí misma no absorbe a esa longitud de onda, se habla de fotosensibilización. La energía de excitación puede ser transferida directamente al aceptor, que pasa así a su estado excitado, o puede ser usada en alguna reacción entre el sensibilizador activado y las moléculas aceptoras (ejemplo: reacciones redox), con la subsecuente recuperación del sensibilizador por un proceso secundario. La fotooxidación sensibilizada de enzimas conduce a la destrucción de algunos de sus aminoácidos (Taylor y Radda, 1972).

La técnica de fotooxidación de enzimas inducida por distintos cromóforos se introdujo hace 40 años para la identificación de residuos esenciales del sitio catalítico (Weil y col., 1951; Westhead, 1965; Martínez Carrión 1967; Jori y col., 1970). Para algunas enzimas y bajo determinadas condiciones, el método es útil para el estudio de mecanismos de reacción o identificación de grupos funcionales (Westhead, 1972). La técnica consiste simplemente en la irradiación de una solución conteniendo la proteína, el fotosensibilizador y oxígeno por el tiempo necesario para poder medir cambios en alguna propiedad de la proteína, generalmente su actividad catalítica.

Varios autores han sugerido que las especies activadas en la fotooxidación sensibilizada por este tipo de compuestos incluyen el propio sensibilizador activado por la energía lumínica, un complejo oxígeno-sensibilizador y oxígeno en estado triplete o singulete (Weil, 1965; Kearns y col., 1967; Foote, 1968).

Además se ha descripto que algunos cromóforos participan en una reacción de transferencia anaeróbica de hidrógeno del sustrato al sensibilizador fotoexcitado (Cavallini y col., 1965; Kearns y col., 1967).

Se pueden emplear un gran número de compuestos para los estudios de oxidación fotosensibilizada, pero los más usados han sido riboflavina y azul de metileno, de naturaleza catiónica, y rosa de Bengala, de naturaleza aniónica. Estos cromóforos exhiben alguna especificidad frente a los aminoácidos libres en solución; sin embargo, con las enzimas la especificidad depende de cada una en particular y del mecanismo por el cual se produce la fotooxidación (Westhead, 1972).

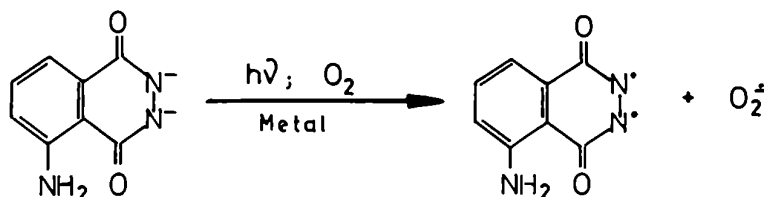
Hemos visto que la URO I produce inactivación de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D, y de otras enzimas citoplasmáticas y mitocondriales. Se decidió entonces estudiar comparativamente el efecto de otros conocidos fotosensibilizadores para lo cual se emplearon distintas concentraciones de luminol, riboflavina (Rf), rosa de Bengala (RB) y azul de metileno (AM).

II.1. LUMINOL

La quimioluminiscencia es la producción de luz por reacciones químicas a partir de compuestos electrónicamente excitados. El luminol (3-aminofthalaldehído) es un compuesto quimioluminiscente, al igual que otros de estructura general hidrazida (Albrecht, 1928; Roswell y White, 1978). Todas las reacciones quimioluminiscentes del luminol son oxidaciones; los mecanismos propuestos para su reacción en solución acuosa requieren la presencia de metales como catalizadores (Epstein y Kuwana, 1965) (Reacción II.1.).

El espectro de fluorescencia del luminol muestra un pico de excitación a 380 nm, por lo que los estudios se realizaron iluminando los hemolizados de GR con luz UV. La iluminación en

presencia de concentraciones crecientes de luminol produjo la inactivación de las cuatro enzimas estudiadas (Figura II.1.). A bajas concentraciones, la actividad del ALA-D desciende rápidamente en condiciones de iluminación, pero no es afectada por la presencia del sensibilizador en oscuridad, mientras que a altas concentraciones, el efecto del luminol parece ser independiente de la luz y del tiempo de contacto (Figura II.1. A). Este último resultado se observó también para PBGasa y deaminasa a todas las concentraciones estudiadas (Figura II.1. B, C); en cambio, URO-D sufrió una fotoinactivación creciente con el aumento de concentración de luminol en la luz, y sólo disminuyó ligeramente su actividad cuando se mantuvo en oscuridad en presencia del sensibilizador (Figura II.1. D)



Reacción II.1.

El luminol podría ejercer una interferencia de tipo estructural sobre las 4 enzimas; no obstante, ALA-D y URO-D serían sensibles a la oxidación inducida por el $\text{O}_2^{\bullet -}$ generado en la reacción lumínica del luminol (Reacción II.1.).

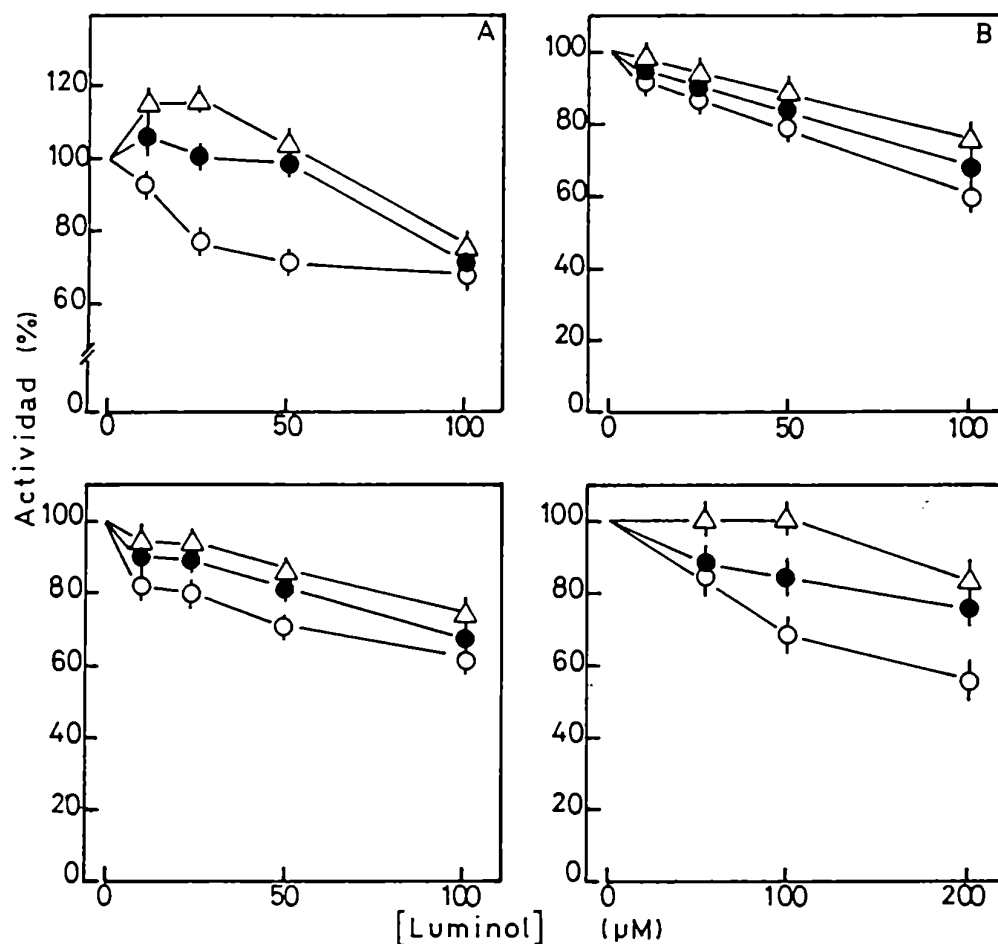


FIGURA II.1.: Efecto de luminol sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D).

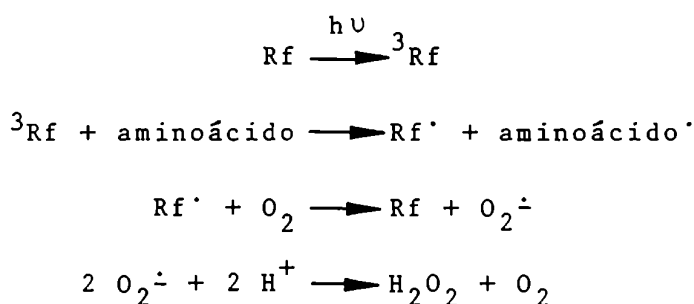
Los hemolizados de GR se trataron con luminol 10, 25, 50 y 100 μM (A, B, C) ó 50, 100 y 200 μM (D), en oscuridad (●) o bajo luz UV (○), durante 2 horas a 37 °C. (△) Controles en presencia de luminol agregado al sistema de incubación de cada enzima.

Los valores presentados son el promedio \pm DS de los datos obtenidos en 3 experiencias realizadas por duplicado, y se expresan como porcentaje de los valores control correspondientes a cada experiencia.

Valores control: ALA-D: $0,028 \pm 0,002$ (n = 15); PBGasa: $0,470 \pm 0,029$ (n = 15); deaminasa: $1,152 \pm 0,031$ (n = 15); URO-D: $0,060 \pm 0,004$ (n = 20). n = número de determinaciones realizadas. Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

II.2. RIBOFLAVINA

Las flavinas son vitaminas presentes en casi todos los tejidos biológicos. Las flavinas de mayor importancia biológica son la Rf, flavina mononucleótido (FMN) y flavina adenina dinucleótido (FAD). Como otros colorantes que absorben luz, estas vitaminas pueden sensibilizar la fotooxidación de una gran variedad de sustratos como aminos, aminoácidos, nucleótidos y iones metálicos (Taylor y Radda, 1972). La mayoría de las fotooxidaciones implican la excitación de la flavina al estado triplete como especie reactiva inicial, aunque en algunos casos se ha reportado la excitación al estado singulete (Song y Metzler, 1967). La flavina triplete puede reaccionar directamente con el sustrato o con oxígeno dando un intermediario reactivo peróxido u 1O_2 . La Rf excitada reacciona con algunos aminoácidos generando la semiquinona. Este radical, a su vez, reacciona con O_2 dando $O_2^{\dot{-}}$, el cual, por dismutación, produce peróxido de hidrógeno (van Steveninck y col., 1986) (Reacción II.2.).



Reacción II.2.

Los espectros de absorción y fluorescencia de Rf en solución acuosa son similares y muestran 2 picos de excitación a 374 y 449 nm, además de otros 2 picos en el UV lejano. La Figura II.2.

muestra los resultados obtenidos al iluminar los hemolizados de GR con luz UV en presencia de concentraciones crecientes de Rf. ALA-D y URO-D sufrieron una significativa fotoinactivación (Figura II.2 A, D), mientras que la actividad de PBGasa y deaminasa se redujo ligeramente en condiciones de iluminación (Figura II.2. B, C). En oscuridad la presencia de Rf sólo afectó a la URO-D (Figura II.2. D).

Los resultados obtenidos sugieren que ALA-D y URO-D son más sensibles a las especies reactivas generadas por la fotoexcitación de Rf. Esta inactivación probablemente se deba a la oxidación de la histidina del sitio activo de estas enzimas, dado que Tomita y col. (1969) estudiando la fotooxidación de histidina y compuestos derivados en presencia de diversos colorantes, encontraron que todos producían especies reactivas de oxígeno, pero la Rf, además, poseía actividad de deshidrogenación específica de este aminoácido.

II.3. ROSA DE BENGALA Y AZUL DE METILENO

Rosa de Bengala y azul de metileno son dos colorantes muy usados en los estudios de fotooxidación de aminoácidos y proteínas; tienen longitud de onda de excitación a 548 nm y 661 nm respectivamente, por lo que los estudios con estos cromóforos se realizaron iluminando los hemolizados de GR, con luz blanca de 200 W.

Las cuatro enzimas fueron significativamente fotoinactivadas por RB, siendo este efecto de mayor magnitud nuevamente en el caso de ALA-D y URO-D (Figura II.3. A, D) que en el caso de PBGasa y deaminasa (Figura II.3. B, C). La presencia del sensibilizador en oscuridad redujo ligeramente las actividades de estas enzimas.

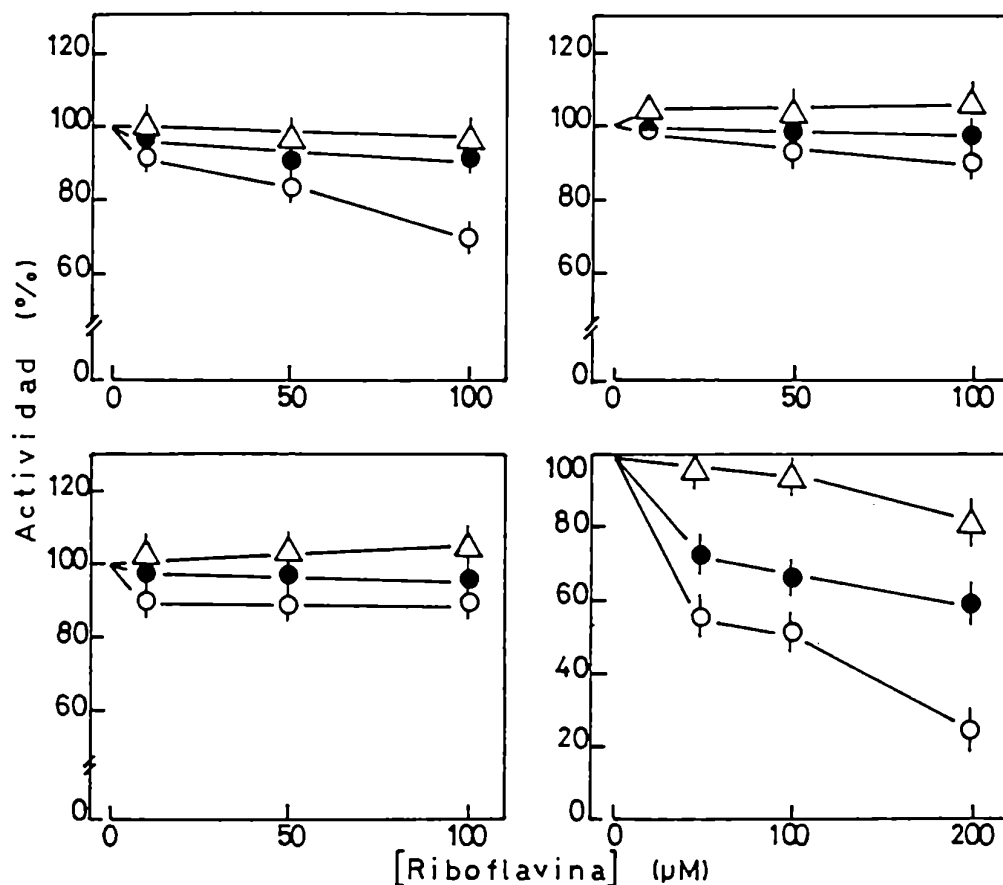


FIGURA II.2.: Efecto de riboflavina sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D).

Los hemolizados de GR se trataron con riboflavina 10, 50 y 100 μM (A, B, C) ó 50, 100 y 200 μM (D), en oscuridad (●) o bajo luz UV (○), durante 2 horas a 37 °C. (△) Controles en presencia de riboflavina agregada al sistema de incubación de cada enzima.

Otros detalles experimentales y valores controles se indican en la leyenda de la Figura II.1.

Los mismos resultados se obtuvieron al iluminar los hemolizados de GR en presencia de AM (Figura II.4.). En oscuridad, el cromóforo causó una importante inactivación de ALA-D y URO-D

(Figura II.4. A, D), mientras que PBGasa y deaminasa prácticamente no fueron afectadas (Figura II.4. B, C).

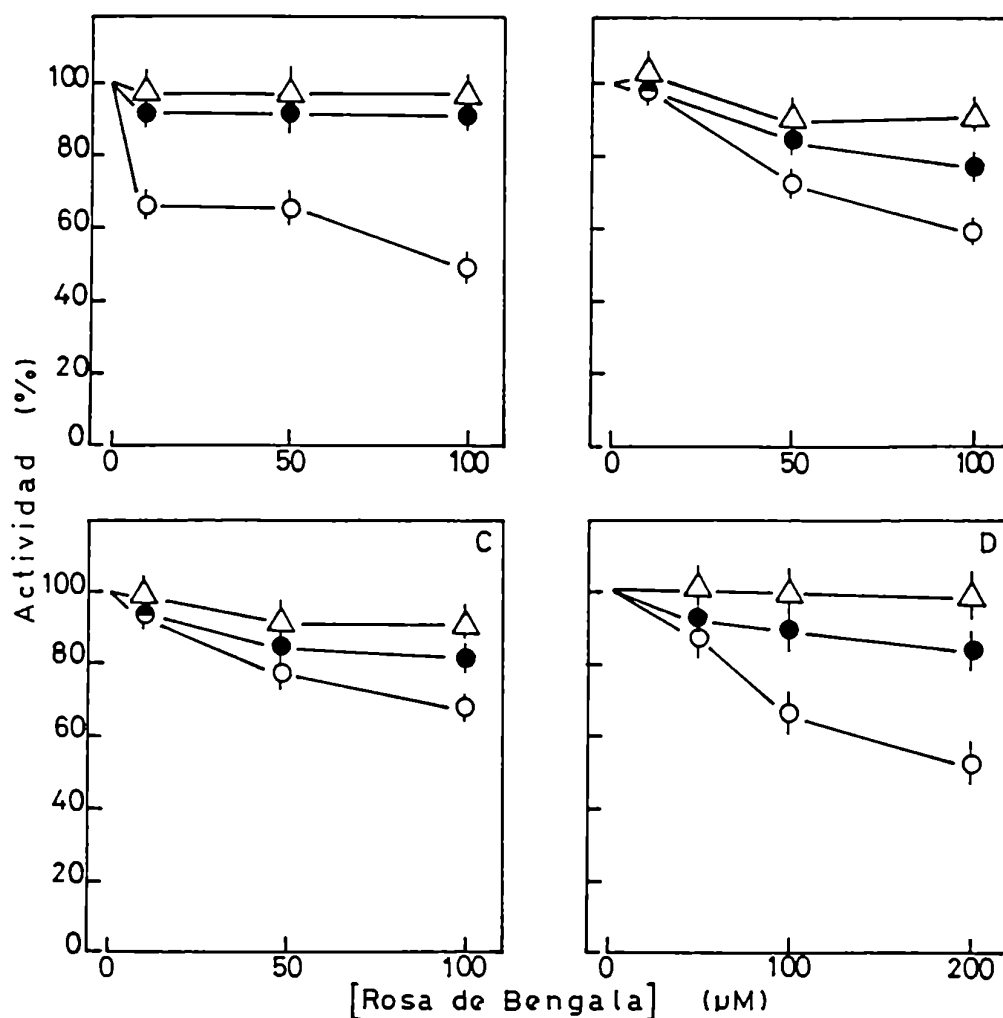


FIGURA II.3.: Efecto de rosa de Bengala sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D).

Los hemolizados de GR se trataron con rosa de Bengala 10, 50 y 100 μM (A, B, C) ó 50, 100 y 200 μM (D), en oscuridad (●) o bajo luz blanca (○), durante 2 horas a 37 °C. (Δ) Controles en presencia de rosa de Bengala agregado al sistema de incubación de cada enzima. Otros detalles experimentales y valores controles se indican en la leyenda de la Figura II.1.

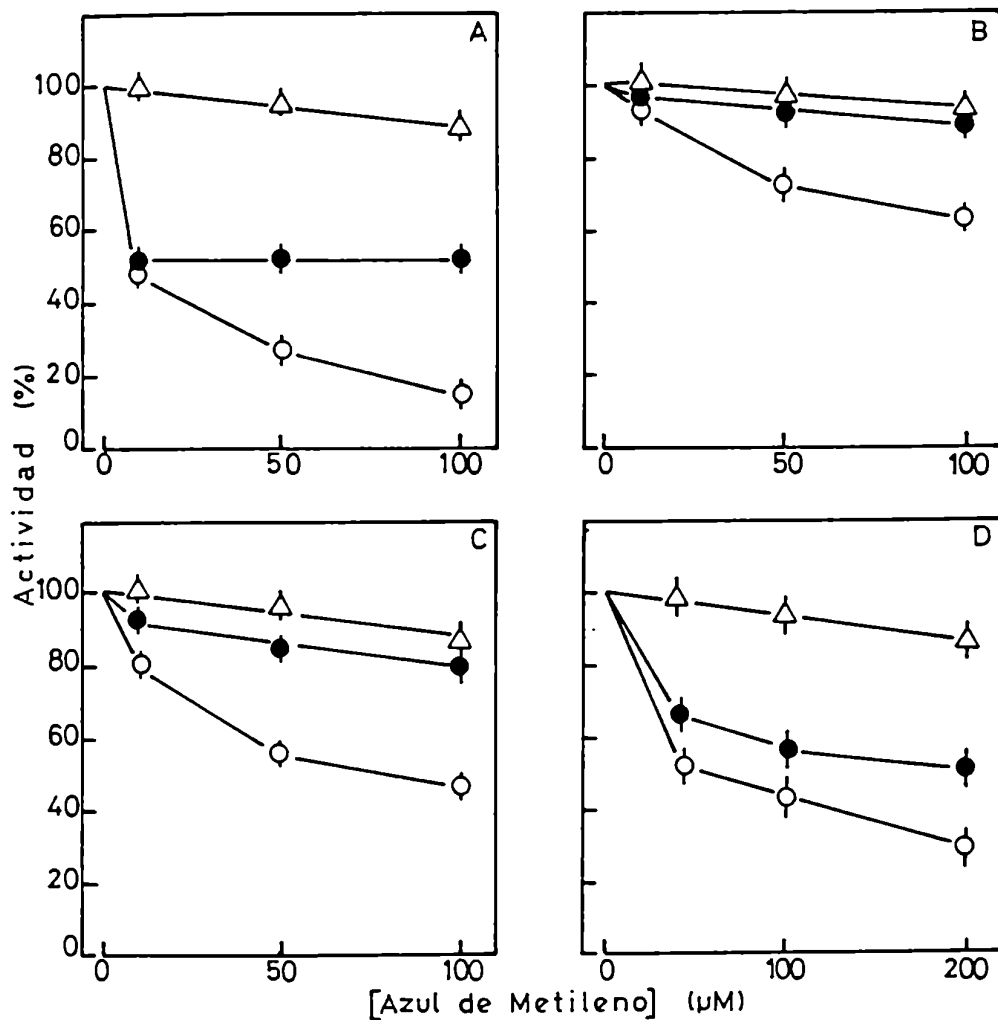


FIGURA II.4.: Efecto de azul de metileno sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D).

Los hemolizados de GR se trataron con azul de metileno 10, 50 y 100 μM (A, B, C) ó 50, 100 y 200 μM (D), en oscuridad (●) o bajo luz blanca (○), durante 2 horas a 37 °C. (△) Controles en presencia de azul de metileno agregado al sistema de incubación de cada enzima. Otros detalles experimentales y valores controles se indican en la leyenda de la Figura II.1.

Se ha demostrado que RB y AM fotooxidan selectivamente la metionina de lisosima y la tirosina de ribonucleasa (Jori y col., 1969). RB fue más específico para la oxidación de histidina de enolasa (Westhead, 1965; Bellin y Yankus, 1968), creatina quinasa (Westhead, 1965), aspartato transaminasa (Martínez-Carrión, 1967) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Bond y col., 1970); mientras que AM fue más eficiente para carboxipeptidasa (Coombs y col., 1964) y además de histidina oxidó grupos -SH (Freidrich y col., 1964). Ambos cromóforos produjeron una fuerte inhibición de ALA-D que fue dependiente de la concentración del sensibilizador y del estado de protonación de los grupos histidilo (Fukuda y col., 1990).

La oxidación de histidina, presente en el sitio activo de ALA-D y URO-D, y de tirosina, en el sitio activo de deaminasa, explicaría los resultados obtenidos con estos dos cromóforos en condiciones de iluminación.

El AM oxida las cadenas laterales de aminoácidos azufrados (Ray, 1967) y oxida tioles a disulfuro, reoxidándose rápidamente el cromóforo reducido por el oxígeno molecular (Reid, 1931). Este efecto sobre los grupos -SH sería la causa de la mayor foto-inactivación de las enzimas comparada con la producida por RB (Figuras II.3. y II.4.); especialmente en el caso de ALA-D, cuya actividad se redujo hasta un 90 %. Se ha sugerido que esta enzima requiere grupos disulfuro para su actividad, manteniendo estos grupos una estructura proteica específica, y que para ésto necesitaría cierto equilibrio entre grupos -SH y S-S (Batlle y col., 1967). La oxidación de los grupos -SH, con la consecuente pérdida del equilibrio entre grupos oxidados y reducidos, sumada a la alteración de la histidina del sitio activo, explicarían el notable efecto producido por el AM sobre esta enzima.

Se ha comprobado que las reacciones oxidativas del AM transcurren en ausencia de luz a la misma velocidad que en iluminación con luz difusa (Cavallini y col., 1965). Probablemente así

se explique la reducción de actividad de ALA-D y URO-D mantenidas en oscuridad en presencia de este sensibilizador (Figura II.4. A, D).

II.4. URO I Y LUZ BLANCA

Teniendo en cuenta el amplio espectro de acción de las porfirinas, y dado que los estudios con RB y AM se realizaron usando luz blanca, se investigó el efecto de URO I sobre la actividad de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D, iluminado los hemolizados de GR en las condiciones estándar, con luz visible de 200 W.

En la Figura II.5. se observa la inactivación de las enzimas que, en el rango ensayado, parece ser independiente de la concentración de la porfirina, siendo a las concentraciones habitualmente usadas (10 μ M para ALA-D, PBGasa y deaminasa; 100 μ M para URO-D) de la misma magnitud que las producidas al iluminar con luz UV (Figura I.5., Capítulo I, Resultados y Discusión).

Seret y col. (1986) obtuvieron valores similares de rendimiento cuántico de degradación de triptofano por iluminación con luz UV o visible en presencia de URO, lo cual está de acuerdo con los resultados aquí presentados. Esto explicaría por qué la porfirina, a igual concentración, produce igual inactivación independientemente de la fuente utilizada para iluminar el sistema.

II.5. CONCLUSIONES

- Se estudió el efecto de distintos fotosensibilizadores sobre la actividad de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D. Usando cantidades crecientes de luminol, Rf, RB y AM, se observó inactivación de todas las enzimas, que fue dependiente de la concentración del cromóforo utilizado.

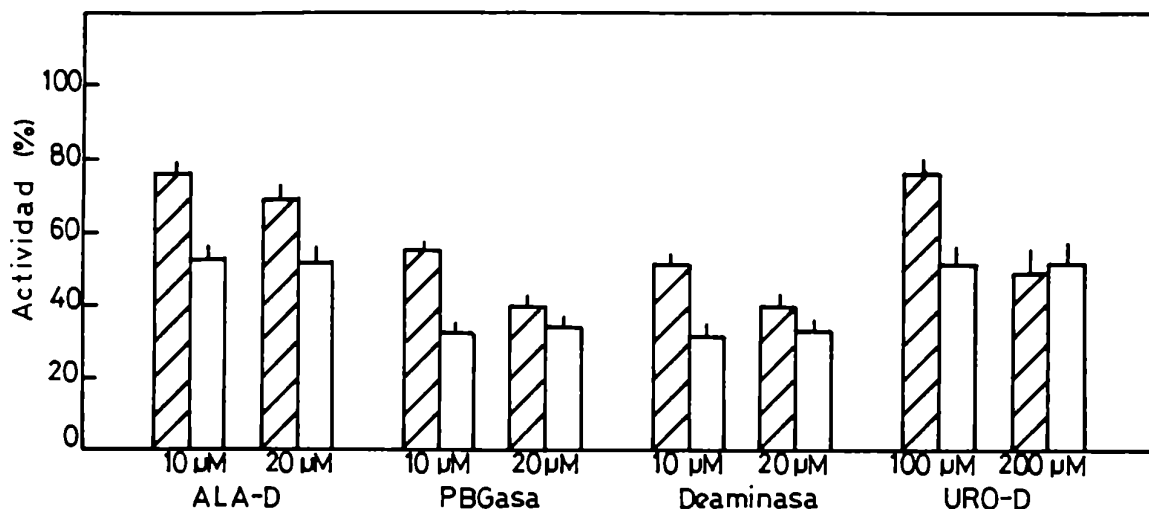


FIGURA II.5.: Efecto de URO I sobre la actividad enzimática de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D.

Los hemolizados de GR se trataron con URO I 10 y 20 μM (ALA-D, PBGasa, deaminasa) ó 100 y 200 μM (URO-D), en oscuridad (▨) o bajo luz blanca (□) durante 2 horas a 37 °C. Los detalles experimentales y valores control se indican en la leyenda de la Figura II.1.

- En todos los casos ALA-D y URO-D resultaron más sensibles que PBGasa y deaminasa al tratamiento con los compuestos estudiados.
- La inactivación enzimática se debería a la oxidación de histidina del sitio activo de ALA-D y URO-D, y de tirosina, del sitio activo de deaminasa.
- El AM produciría también una reacción oxidativa en oscuridad, que causaría la reducción de actividad de ALA-D y URO-D en tales condiciones.
- Iluminando con luz blanca en presencia de URO I se obtuvieron inactivaciones enzimáticas de la misma magnitud que las observadas al iluminar con luz UV.

ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE INACTIVACION FOTODINAMICA Y NO
FOTODINAMICA POR URO I

	Página
III.1. Secuestradores de especies reactivas generadas según el mecanismo tipo II	116
III.2. Secuestradores de especies reactivas generadas según el mecanismo tipo I	116
III.2.1. Secuestradores de electrones	116
III.2.2. Secuestradores de peróxidos lipídicos	119
III.2.3. Secuestrador del radical superóxido	119
III.2.4. Secuestradores de peróxido de hidrógeno	120
III.2.5. Secuestradores de radicales hidroxilo	124
III.3. Efecto del peróxido de hidrógeno	124
III.4. Modificadores de la reacción de Fenton	125
III.5. Mecanismo propuesto	130
III.6. Conclusiones	134

III. ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE INACTIVACION FOTODINAMICA Y NO FOTODINAMICA POR URO I

Un radical libre puede definirse como cualquier especie que tenga uno o más electrones desapareados. Esta definición tan amplia incluye al átomo de hidrógeno (con un electrón desapareado), la mayoría de los metales de transición y la molécula de oxígeno.

El oxígeno tiene dos electrones desapareados, cada uno en un distinto orbital antiligante Π^* , ambos con el mismo número cuántico de espín. Para que el oxígeno oxide otro átomo o molécula aceptando estos electrones, los dos nuevos electrones deberán ser de espín paralelo para llenar los espacios vacantes en los orbitales Π^* . Sin embargo, de acuerdo con el principio de Pauli, un par de electrones en un orbital atómico o molecular debe tener espines antiparalelos. Esto impone una restricción a las oxidaciones por oxígeno, las cuales tienden a hacer que el oxígeno acepte los electrones de uno por vez, tornando más lenta la reacción con especies no radicales (Halliwell y Gutteridge, 1984) (Figura III.1.).

Una forma de aumentar la reactividad del oxígeno es mover uno de los electrones desapareados de modo de evitar la restricción de espín. Hay dos estados singulete del oxígeno: el $^1\Delta_g$, el más importante en sistemas biológicos, que no tiene electrones desapareados y no es un radical, y el $^1\Sigma^+_g$, que generalmente decae al estado $^1\Delta_g$ antes de tener tiempo de reaccionar con algún sustrato (Figura III.1.). El estado de excitación $^1\Delta_g$ del oxígeno se obtiene cuando distintos pigmentos biológicos, como clorofilas, flavinas, porfirinas, etc. son iluminados en presencia de oxígeno (Foote, 1982).

Si un electrón es aceptado por el oxígeno en su estado basal, éste debe entrar en uno de los orbitales Π^* antienlazantes; el producto es el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Figura III.1.). El

radical $O_2^{\cdot -}$ se forma en casi todas las células aeróbicas (Fridovich, 1978; Halliwell, 1981).

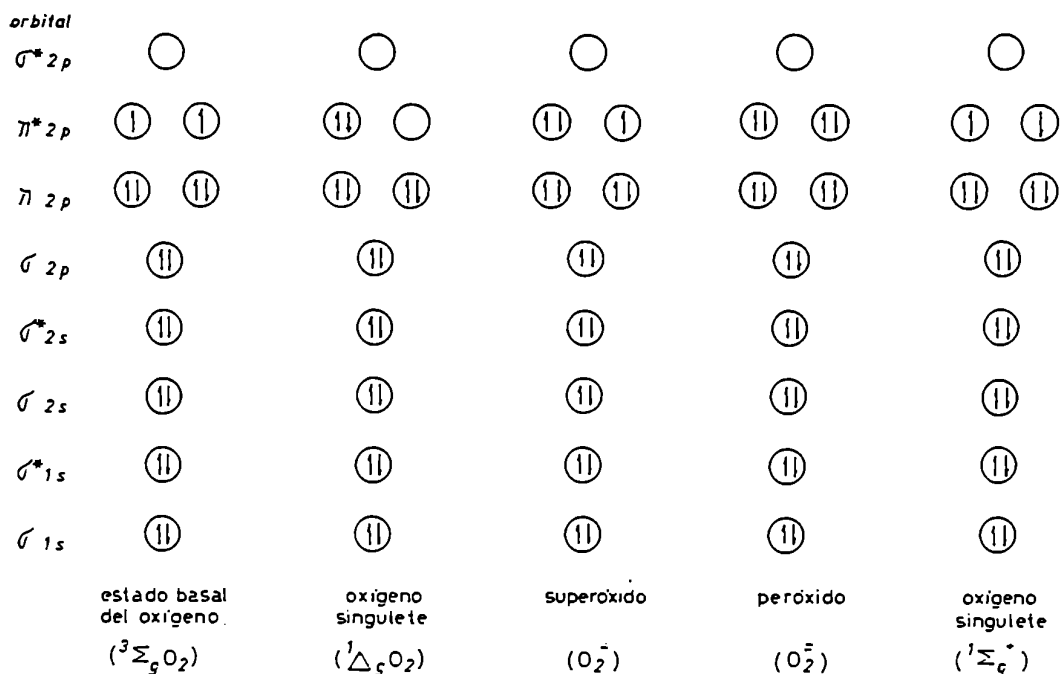
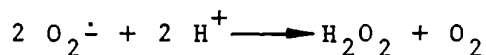


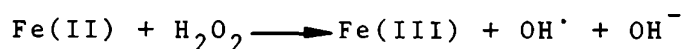
FIGURA III.1.: Especies reactivas del oxígeno

La adición de un segundo electrón al $O_2^{\cdot -}$ da el ión peróxido ($O_2^{=}$), que no tiene electrones desapareados y no es radical. A pH fisiológico el $O_2^{=}$ se protona inmediatamente para dar peróxido de hidrógeno, ya que el pKa del peróxido de hidrógeno es muy alto (Halliwell y Gutteridge, 1984). En solución acuosa el $O_2^{\cdot -}$ sufre una reacción de dismutación para formar peróxido de hidrógeno y oxígeno (Reacción III.1.).



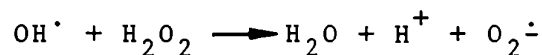
Reacción III.1.

La fisión homolítica del enlace O-O del peróxido de hidrógeno produce dos radicales OH[·]. La homólisis se produce por ca lentamiento o por radiación ionizante, pero la simple mezcla de peróxido de hidrógeno y una sal de hierro (II) también forma radi cales OH[·], como fue observado por Fenton en 1894 (Walling, 1982) (Reacción III.2.):



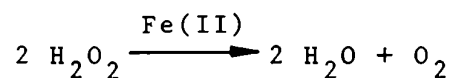
Reacción III.2.

Trazas de hierro (III) pueden reaccionar con peróxido de hidrógeno, dando una serie de reacciones que involucran radicales libres (Reacción III.3.):



Reacción III.3.

Si el OH[·] no es interceptado por algún otro reactivo, la suma total de estas reacciones será la Reacción III.4.



Reacción III.4.

En sistemas biológicos, en presencia de un fotosensibilizador y energía lumínica, se genera una o varias de estas especies reactivas de oxígeno mediante los mecanismos tipo I o tipo II (Figura III.2.). La preponderancia de uno u otro mecanismo en cualquier sistema fotoinducido depende de factores tales como: i) capacidad del fotosensibilizador para interactuar con el sistema, ii) constante de velocidad para la reacción del sensibilizador excitado con oxígeno versus la reacción del sensibilizador excitado con la biomolécula blanco (BH), y iii) concentraciones relativas de oxígeno y BH que encuentra el sensibilizador excitado (Grossweiner y col., 1982).

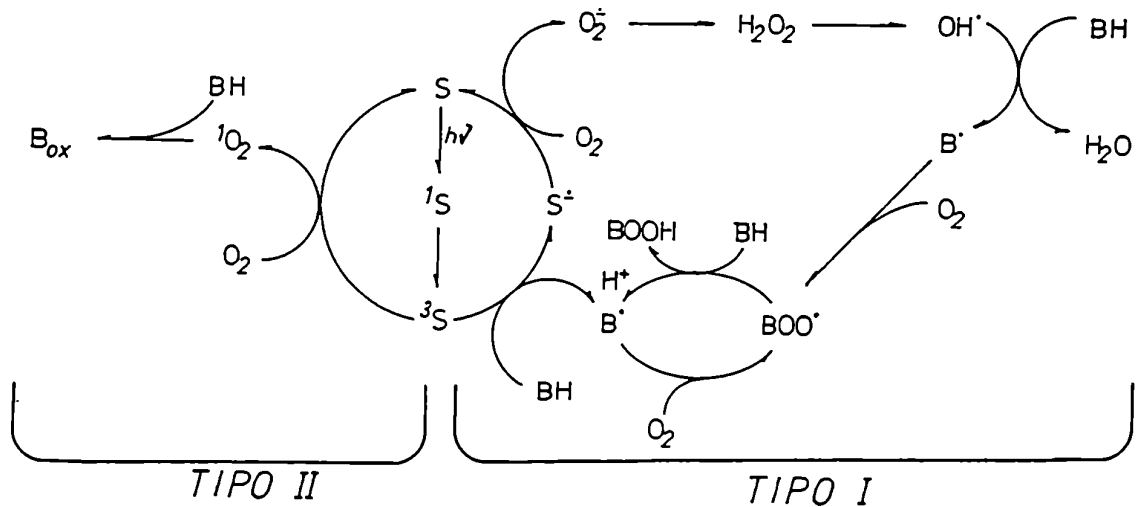


FIGURA III.2.: Mecanismos de fotooxidación de biomoléculas.
S: Sensibilizador; BH: biomolécula

Para establecer cuál de los dos mecanismos está ocurriendo durante la fotoinactivación de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D en presencia de URO I, se estudió el efecto de distintos secuestradores o "scavengers" específicos de radicales libres sobre dicha inactivación.

III.1. SECUESTRADORES DE ESPECIES REACTIVAS GENERADAS SEGUN EL MECANISMO TIPO II

Hemos dicho que las reacciones tipo II son mediadas por 1O_2 . Para evaluar si el efecto de URO I sobre las actividades de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D se debe a un mecanismo de este tipo, se preincubaron los hemolizados de GR con "scavengers" específicos de 1O_2 y luego se trataron con la porfirina en las condiciones estándar.

La Figura III.3. muestra los resultados obtenidos usando azida de sodio e histidina como "scavengers" de 1O_2 (Sconfienza y col., 1980; Dixit y col., 1983). En ningún caso se encontró protección de las enzimas frente a la inactivación producida por URO I, indicando que este efecto no sería mediado por un mecanismo tipo II o, al menos, que no sería ésta la reacción preponderante.

III.2. SECUESTRADORES DE ESPECIES REACTIVAS GENERADAS SEGUN EL MECANISMO TIPO I

III.2.1. Secuestradores de electrones

Las reacciones de tipo I comienzan con la transferencia de un electrón del sensibilizador en estado triplete excitado a una biomolécula blanco, para formar radicales libres (Lee y Rodgers, 1987; Dávila y Harriman, 1989). Si el mecanismo por el cual actúa la URO I es de este tipo, es de esperar que un "scavenger" de electrones impida la formación de radicales libres y, por lo tanto, la inactivación de las enzimas. Este efecto se investigó usando cisteína y ferricianuro de potasio como "scavengers" de electrones (Sconfienza y col., 1980).

Cisteína y ferricianuro de potasio protegieron la actividad de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D frente al efecto de URO I

(Figura III.4.), sugiriendo que en el mecanismo de inactivación inducido por la porfirina estaría involucrada la transferencia de electrones.

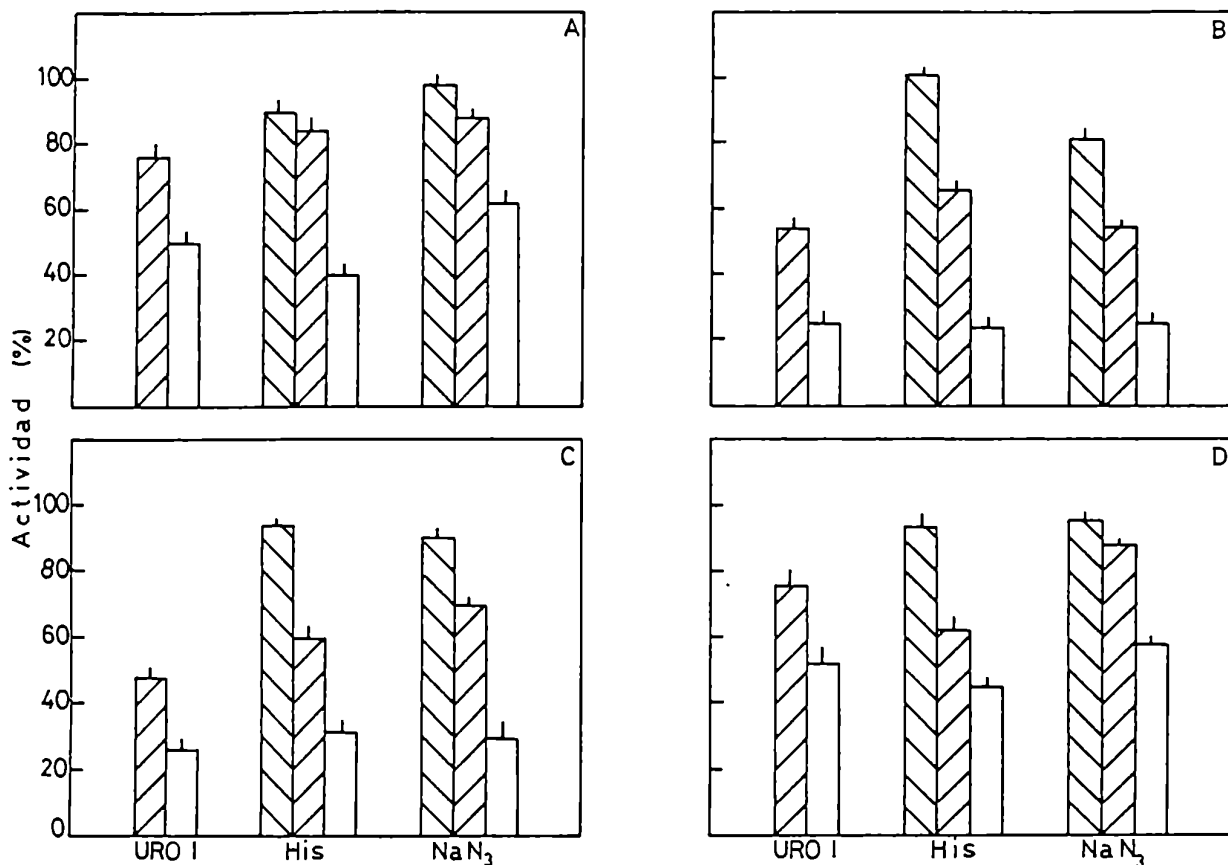


FIGURA III.3.: Efecto de la presencia de "scavengers" de oxígeno singlete sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D).

Los hemolizados de GR fueron preincubados durante 30 minutos a 0 °C en presencia de histidina (15 mM) o azida de sodio (15 mM); luego se agregó URO I 10 μ M (A,B,C) ó 100 μ M (D) y se mantuvieron en oscuridad (▨) o bajo luz UV (□) durante 2 horas a 37 °C. (▨) Controles en presencia de histidina o azida de sodio agregados al sistema de incubación de cada enzima. Los valores presentados son el promedio \pm DS de los datos obtenidos en 3 experiencias realizadas por duplicado, y se expresan como porcentaje de los valores control correspondientes a cada experiencia. Valores control: ALA-D: 0,028 \pm 0,002 (n = 15); PBGasa: 0,470 \pm 0,029 (n = 15); deaminasa: 1,152 \pm 0,031 (n = 15); URO-D: 0,060 \pm 0,004 (n = 20). n = número de determinaciones realizadas. Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

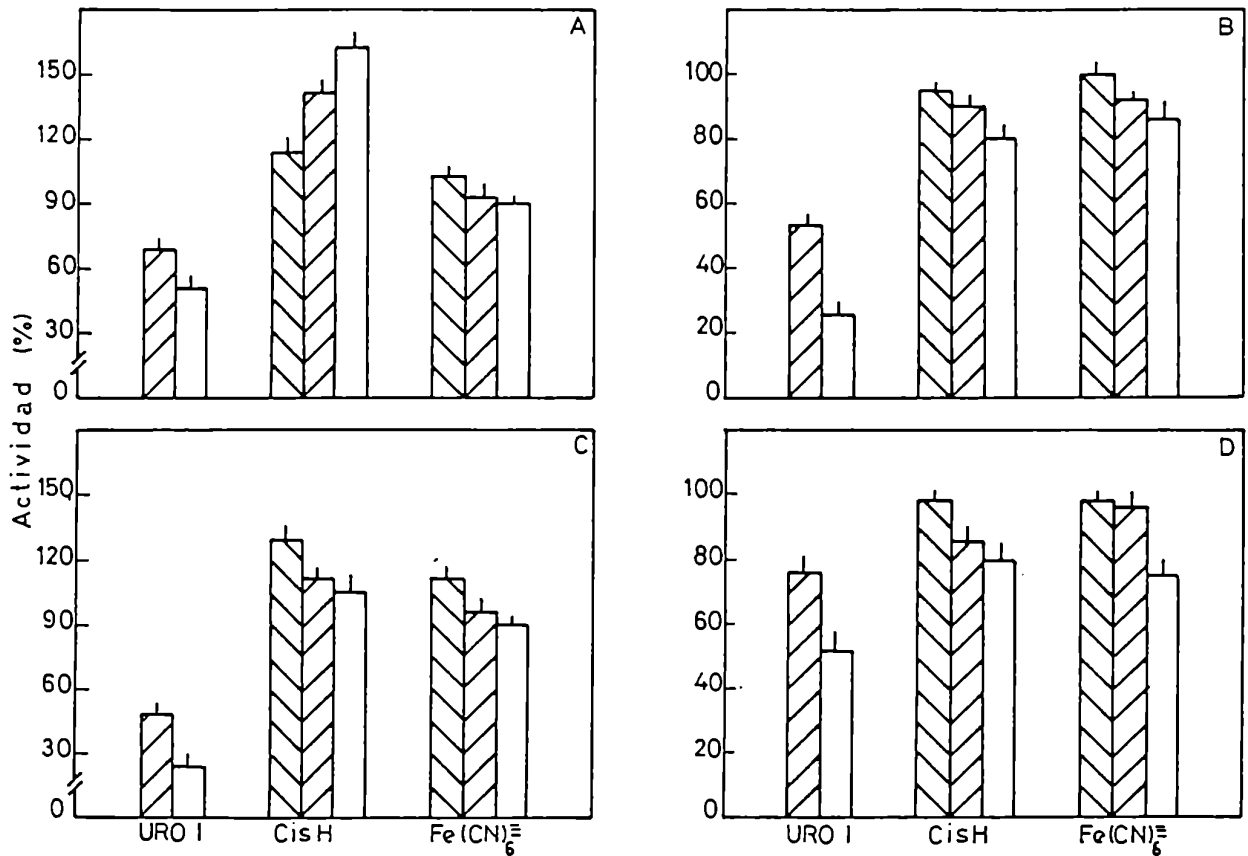


FIGURA III.4.: Efecto de la presencia de "scavengers" de electrones sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasá (B), deaminasa (C) y URO-D (D). Los hemolizados de GR fueron preincubados durante 30 minutos a 0 °C en presencia de cisteína (15 mM) o ferricianuro de potasio (1 mM), luego se agregó URO I 10 μ M (A, B, C) ó 100 μ M (D) y se mantuvieron en oscuridad (▨) o bajo luz UV (□) durante 2 horas a 37 °C. (▨) Controles en presencia de cisteína o ferricianuro de potasio agregados al sistema de incubación de cada enzima. Otros detalles experimentales y los valores controles se indican en la leyenda de la Figura III.3.

III.2.2. Secuestradores de peróxidos lipídicos

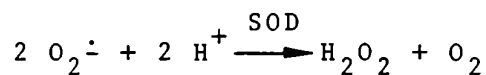
Estudios acerca del efecto fotodinámico de las porfirinas sobre sistemas conteniendo células intactas o fantasmas de eritrocitos, indican que el daño celular primario se debería a la ruptura de la membrana por peroxidación de sus constituyentes lipídicos (de Goeij y col., 1975; Dubbelman y col., 1980; Girotti, 1990). Si bien en este trabajo se usaron hemolizados de GR como fuente enzimática, se investigó la presencia de peróxidos lipídicos como mediadores de la inactivación enzimática inducida por URO I. Para esto se incubaron las enzimas en presencia de α -T, BHT, α -T más BHT y ácido ascórbico, todos conocidos "scavengers" de peróxidos lipídicos que inhiben la propagación de radicales libres por transferencia de un hidrógeno al radical peróxido BOO^{\cdot} (Figura III.2.) (Girotti, 1990).

En la Figura III.5. se puede ver que hubo protección de la inactivación de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D en presencia de estos "scavengers". Estos resultados sugieren que el efecto de URO I no estaría mediado por la formación de peróxidos lipídicos.

III.2.3. Secuestrador del radical superóxido

El $\text{O}_2^{\cdot-}$ es un agente sumamente tóxico, producido en distintos sistemas biológicos como los leucocitos durante la fagocitosis activa (Babior y col., 1973) o los eritrocitos (Orten y Neuhaus, 1984), y es también producto secundario de diversas reacciones enzimáticas (Fridovich y Handler, 1962; Rajagopalan y col., 1964; Fridovich, 1970; Rotilio y col., 1970).

La SOD es una enzima altamente específica que cataliza la dismutación del radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Reacción III.5.):



Reacción III.5.

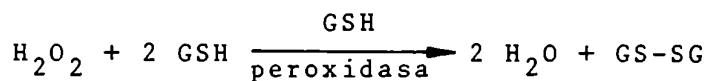
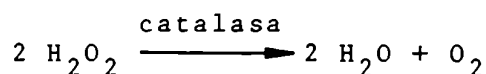
y se encuentra en diversos organismos aerobios como defensa contra la producción de esta especie reactiva de oxígeno.

Dada la alta especificidad de esta enzima, si un proceso es inhibido por SOD, se puede concluir que el $O_2^{\cdot-}$ jugaba un rol esencial en dicho proceso (Fridovich, 1974).

En la Figura III.6. se puede ver que la preincubación de los hemolizados de GR con SOD no impidió la inactivación de las enzimas por URO I. Estos resultados indicarían entonces que el $O_2^{\cdot-}$ no sería el causante de la inactivación enzimática. Sin embargo, no se puede descartar totalmente la formación de este radical inducida por la porfirina excitada, ya que la dismutación de $O_2^{\cdot-}$ por SOD produce peróxido de hidrógeno (Reacción III.5.), otra especie reactiva de oxígeno capaz de oxidar biomoléculas.

III.2.4. Secuestradores de peróxido de hidrógeno

La SOD presente en los eritrocitos produce peróxido de hidrógeno, que luego es descompuesto por el sistema GSH peroxidasa o por catalasa, dos enzimas que se encuentran normalmente en GR (Cohen y Hochstein, 1963; Jaffé, 1964; Orten y Neuhaus, 1984) (Reacción III.6.).



Reacción III.6.

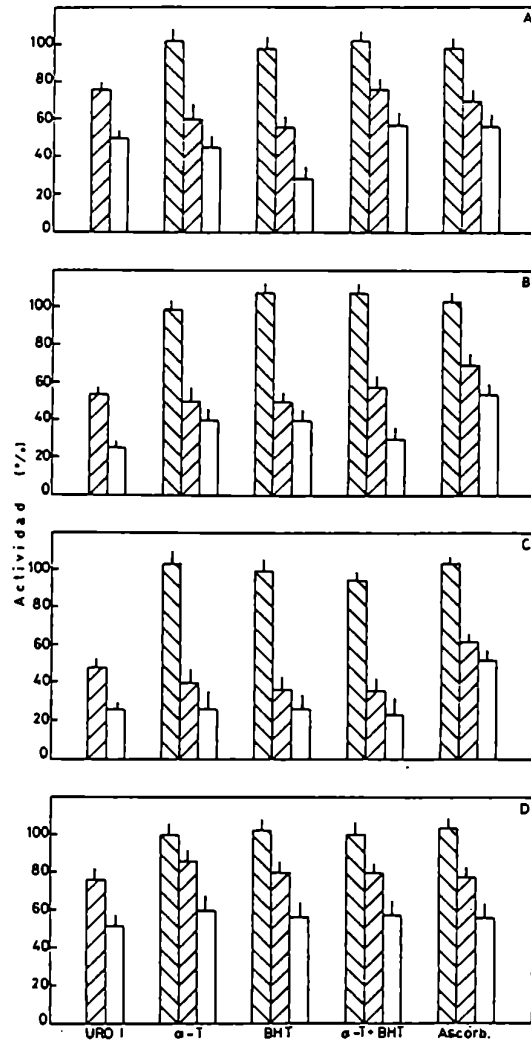


FIGURA III.5.: Efecto de la presencia de "scavengers" de peróxidos lipídicos sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D).

Los hemolizados de GR fueron preincubados durante 30 minutos a 0 °C en presencia de α -T (20 μ M), BHT (20 μ M), α -T (20 μ M) + BHT (20 μ M) o ácido ascórbico (20 mM); luego se agregó URO I 10 μ M (A, B, C) ó 100 μ M (D), y se mantuvieron en oscuridad (▨) o bajo luz UV (□) durante 2 horas a 37 °C. (▨) Controles en presencia de α -T, BHT, α -T + BHT o ácido ascórbico agregados al sistema de incubación de cada enzima. Otros detalles experimentales y los valores controles se indican en la leyenda de la Figura III.3.

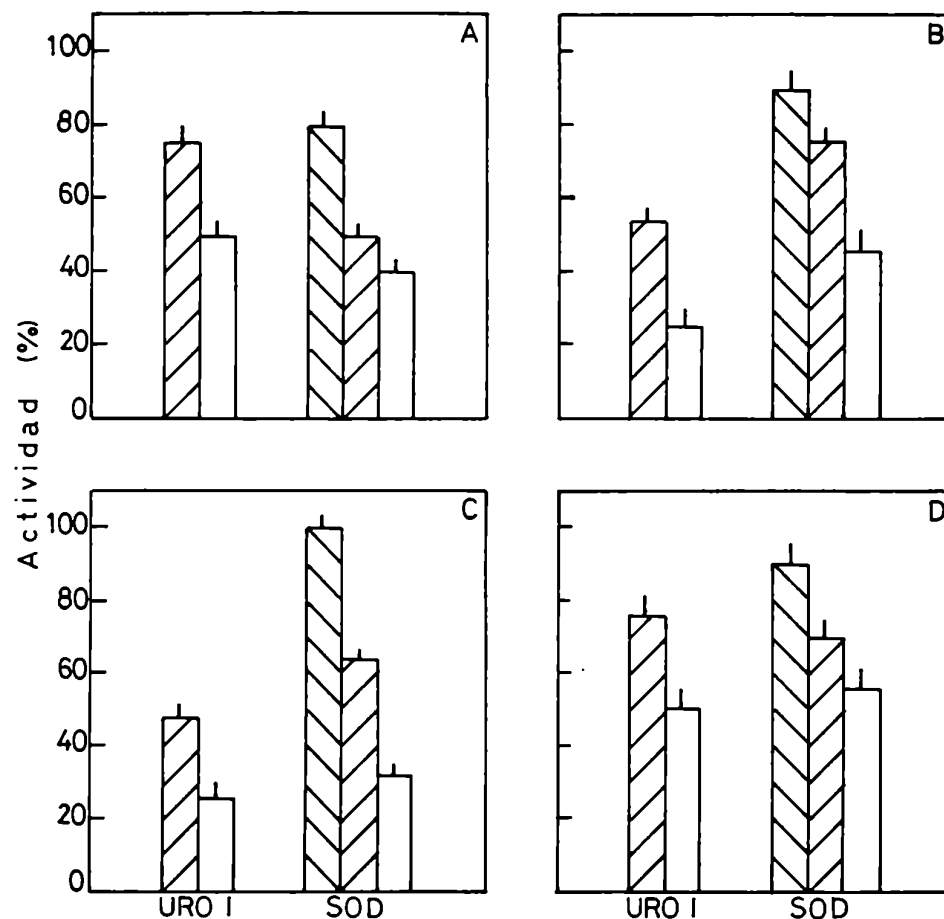


FIGURA III.6.: Efecto de la presencia de SOD sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D). Los hemolizados de GR fueron preincubados durante 30 minutos a 0 °C en presencia de SOD (10 μM); luego se agregó URO I 10 μM (A, B, C) ó 100 μM (D), y se mantuvieron en oscuridad (▨) o bajo luz UV (□) durante 2 horas a 37 °C. (▩) Controles en presencia de SOD agregada al sistema de incubación de cada enzima. Otros detalles experimentales y los valores controles se indican en la leyenda de la Figura III.3.

La preincubación de los hemolizados de GR con catalasa protegió a las enzimas de la inactivación por URO I (Figura III.7.). Esta protección no fue tan efectiva cuando se preincubó con GSH, sustrato de la GSH peroxidasa, aunque las enzimas retuvieron el 60 % o más de su actividad (Figura III.7.).

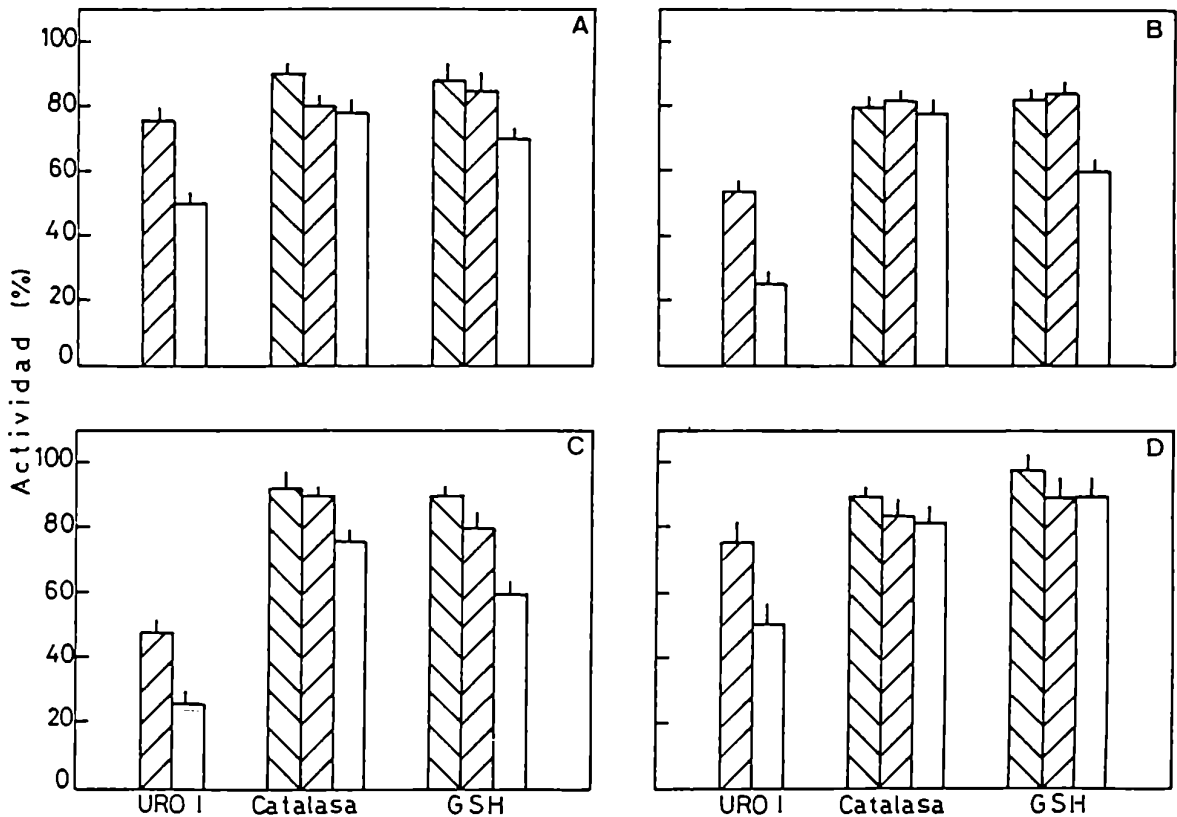


FIGURA III.7.: Efecto de la presencia de "scavengers" de peróxido de hidrógeno sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D).

Los hemolizados de GR fueron preincubados durante 30 minutos a 0 °C en presencia de catalasa (200 nM) o GSH (15 mM); luego se agregó URO I 10 μ M (A, B, C) ó 100 μ M (D), y se mantuvieron en oscuridad (▨) o bajo luz UV (□) durante 2 horas a 37 °C. (▨) Controles en presencia de catalasa o GSH agregados al sistema de incubación de cada enzima. Otros detalles experimentales y los valores controles se indican en la leyenda de la Figura III.3.

Estos resultados indicarían que el peróxido de hidrógeno está involucrado en la inactivación enzimática inducida por URO I.

III.2.5. Secuestradores de radicales hidroxilo

Los complejos de hierro que existen naturalmente *in vivo* reaccionan con el peróxido de hidrógeno, generando OH' por la conocida reacción de Fenton (Reacción III.2.) (Gutteridge, 1985; Imlay y col., 1988). Esta reacción ocurre debido a la continua reducción del hierro (III) a hierro (II) por el $O_2^{\cdot-}$, y por lo tanto requiere cantidades submicromolares de hierro (Haseloff y Ebert, 1989; Tyrrel y Keyse, 1990).

Dado que la fuente enzimática utilizada es un hemolizado de GR que contiene complejos de hierro, es de esperar que se produzcan radicales OH' a partir del peróxido de hidrógeno generado por la URO I excitada. Se preincubaron, entonces, los hemolizados de GR en presencia de etanol, glucosa o DMSO, conocidos "scavengers" de OH' (Anbar y Neta, 1967; Sagone y col., 1983; Das y col., 1985; Tyrrel y Keyse, 1990).

En la Figura III.8. se puede ver que los tres "scavengers" protegieron efectivamente las actividades enzimáticas de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D. Los resultados hasta aquí obtenidos indican que tanto el peróxido de hidrógeno como el OH' están involucrados en la inactivación enzimática producida por URO I.

III.3. EFEECTO DEL PEROXIDO DE HIDROGENO

Suponiendo que la inactivación enzimática inducida por URO I es mediada por peróxido de hidrógeno, sería de esperar que el tratamiento directo de los hemolizados de GR con peróxido de hidrógeno produjera el mismo efecto inactivante que la porfirina.

Sin embargo, el agregado de distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno no produjo alteraciones significativas en las actividades de ALA-D (Tabla III.1.), PBGasa (Tabla III.2.), deaminasa (Tabla III.3.) y URO-D (Tabla III.4.).

Para investigar la causa de esta falta de efecto del peróxido de hidrógeno, se hizo una dilución $1:10^4$ de un hemolizado de GR, se le agregó peróxido de hidrógeno en una concentración final de 75 mM y se leyó la absorbancia a 240 nm durante 10 minutos (Figura III.9.). Se puede ver que ya a los 4 minutos se alcanza prácticamente el valor de la absorbancia de la muestra sin agregado de peróxido de hidrógeno, lo cual indica que el sistema encargado de la degradación de esta especie citotóxica (catalasa y/o GSH peroxidasa) es muy activo y destruye rápidamente todo el peróxido de hidrógeno exógeno.

Estos resultados, sin embargo, no descartan necesariamente al peróxido de hidrógeno como mediador de la inactivación inducida por URO I, ya que se debe tener en cuenta que para que se produzca una reacción del tipo propuesto es necesario que el sensibilizador, los intermediarios y la biomolécula blanco estén en estrecho contacto, dada la corta vida media de las especies en estado triplete excitado y la alta reactividad de las especies radicales. Si la inactivación enzimática se produce por generación de OH^\cdot a través de la reacción de Fenton, el peróxido de hidrógeno podría formarse muy cerca de su blanco, y producir OH^\cdot muy rápidamente, de modo que catalasa y/o GSH peroxidasa no llegarían a degradarlo.

III.4. MODIFICADORES DE LA REACCION DE FENTON

Para establecer entonces si el peróxido de hidrógeno y el OH^\cdot están o no involucrados en la inactivación enzimática inducida por URO I, se preincubaron los hemolizados de GR con distintos quelantes de hierro que alteran la velocidad de la reacción de Fenton en distinta forma.

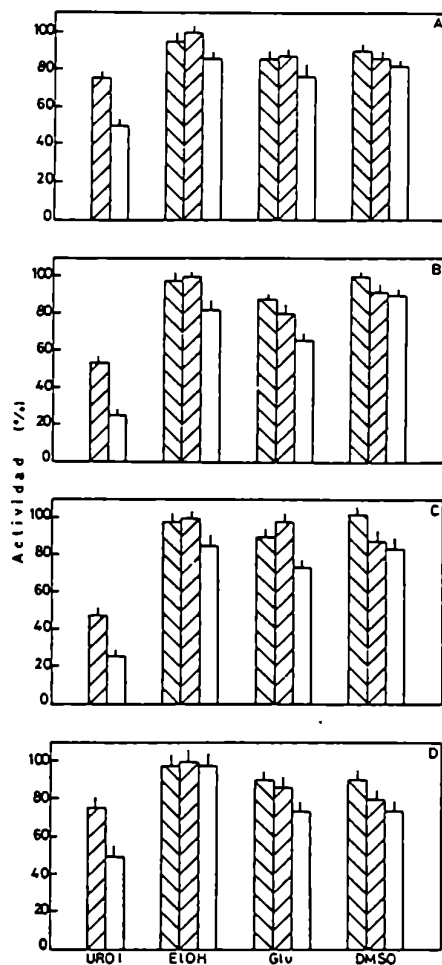


FIGURA III.8.: Efecto de la presencia de "scavengers" de radicales hidroxilos sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D).

Los hemolizados de GR fueron preincubados durante 30 minutos a 0 °C en presencia de etanol (15 mM), glucosa (11 mM) y DMSO (1,2 μM); luego se agregó URO I 10 μM (A, B, C) ó 100 μM (D), y se mantuvieron en oscuridad (▨) o bajo luz UV (□) durante 2 horas a 37 °C. (▩) Controles en presencia de etanol, glucosa o DMSO agregados al sistema de incubación de cada enzima. Otros detalles experimentales y los valores controles se indican en la leyenda de la Figura III.3.

TABLA III.1.: Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad enzimática de ALA-D

CONDICIONES DE ILUMINACION	ACTIVIDAD (%)				
	(H ₂ O ₂) (mM)				
	0,01	0,02	0,05	0,50	1,00
Oscuridad	94 ± 3	101 ± 1	94 ± 2	93 ± 2	90 ± 4
Luz UV	100 ± 2	91 ± 4	97 ± 2	94 ± 3	96 ± 4

Los hemolizados de GR se trataron con concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno y se mantuvieron en oscuridad o bajo luz UV durante 2 horas a 37 °C. Los valores presentados son el promedio ± DS de los datos obtenidos en 3 experiencias realizadas por duplicado, y se expresan como porcentaje del control sin agregado de peróxido de hidrógeno. Valor control: 0,028 ± 0,002 (n = 15); n = número de determinaciones realizadas. Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

La o-fenantrolina es un quelante de hierro (III) que inhibe la reacción de Fenton porque impide su reducción a hierro (II) (Halliwell, 1978). En la Figura III.10. se puede ver que la presencia de o-fenantrolina protegió efectivamente la actividad de las cuatro enzimas estudiadas.

El DETAPAC es otro quelante de hierro (III) que inhibe la reacción de Fenton, porque el hierro de estos complejos es reducido lentamente a hierro (II) (Butler y Halliwell, 1982). La presencia de este quelante también protegió las actividades de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D de la inactivación por URO I (Figura III.10.) aunque no fue tan efectivo como la o-fenantrolina. Esta eficiencia menor podría deberse a que la reducción del hierro

en el complejo hierro (III)-DETAPAC no está impedida totalmente sino retardada.

TABLA III.2.: Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad enzimática de PBGasa

CONDICIONES DE ILUMINACION	ACTIVIDAD (%)				
	(H ₂ O ₂) (mM)				
	0,01	0,02	0,05	0,50	1,00
Oscuridad	98 ± 3	95 ± 4	90 ± 4	100 ± 3	100 ± 2
Luz UV	110 ± 4	120 ± 4	120 ± 4	118 ± 4	120 ± 4

Valor control: 0,470 ± 0,029 (n = 15). Los detalles experimentales se indican en la leyenda de la Tabla III.1.

ATP y EDTA son otros quelantes de hierro, aunque su efecto sobre la reacción de Fenton es opuesto al de o-fenantrolina y DETAPAC; ambos promueven la generación de OH' debido a que en estos casos el hierro (III) en el complejo correspondiente se reduce rápidamente a hierro (II) (Butler y Halliwell, 1982; Floyd, 1983; Flitter y col., 1983; Halliwell y Gutteridge, 1984). En la Figura III.11. se puede ver, como se esperaba, que el efecto de URO I en presencia de estos compuestos es similar o aún mayor que el producido por la porfirina sola.

Estos resultados confirmarían que la inactivación enzimática inducida por URO I está mediada por las especies peróxido de hidrógeno/OH', vía reacción de Fenton.

TABLA III.3.: Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad enzimática de deaminasa

CONDICIONES DE ILUMINACION	ACTIVIDAD (%)				
	(H ₂ O ₂) (mM)				
	0,01	0,02	0,05	0,50	1,00
Oscuridad	101 ± 3	98 ± 2	95 ± 3	98 ± 4	97 ± 3
Luz UV	120 ± 4	120 ± 4	120 ± 4	101 ± 3	97 ± 3

Valor control: 1,152 ± 0,031 (n = 15). Los detalles experimentales se indican en la leyenda de la Tabla III.1.

TABLA III.4.: Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la actividad enzimática de URO-D

CONDICIONES DE ILUMINACION	ACTIVIDAD (%)				
	(H ₂ O ₂) (mM)				
	0,05	0,10	0,50	1,00	5,00
Oscuridad	98 ± 5	101 ± 5	94 ± 4	100 ± 5	101 ± 5
Luz UV	100 ± 5	99 ± 3	98 ± 4	98 ± 5	99 ± 4

Valor control: 0,060 ± 0,004 (n = 20). Los detalles experimentales se indican en la leyenda de la Tabla III.1.

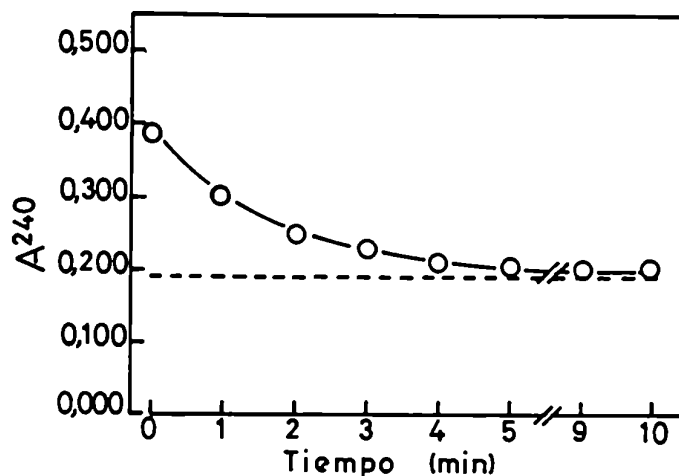


FIGURA III.9.: Curva de consumo de peróxido de hidrógeno. Al hemolizado de GR, diluído $1:10^4$, se le agregó peróxido de hidrógeno (concentración final 75 mM) y se midió la caída de la absorbanza a 240 nm durante 10 minutos (○—○). (---) Absorbanza a 240 nm del hemolizado de GR diluído, sin agregado de peróxido de hidrógeno. Los detalles experimentales se indican en el texto.

III.5. MECANISMO PROPUESTO

En base a los datos obtenidos usando "scavengers" de distintas especies reactivas, podemos decir que la inactivación enzimática inducida por URO I se debería principalmente a un mecanismo tipo I que involucra la formación de peróxido de hidrógeno y OH^\cdot como especies reactivas preponderantes.

Hemos visto que el peróxido de hidrógeno se genera a partir de $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Reacción III.1.), aunque no se pudo demostrar directamente la presencia de este radical. Sin embargo, recientemente Bachowsky y col., (1988) y van Steveninck y col. (1988), por

resonancia de espín electrónico, detectaron la presencia de un radical aniónico URO^- cuando iluminaron suspensiones de fantasmas de eritrocitos cargados con URO I. La generación de OH^{\cdot} en estos sistemas fue insensible al tratamiento con SOD, por lo que los autores concluyeron que el radical URO^- podría reaccionar en forma similar al $O_2^{\cdot-}$, permitiendo la formación de peróxido de hidrógeno.

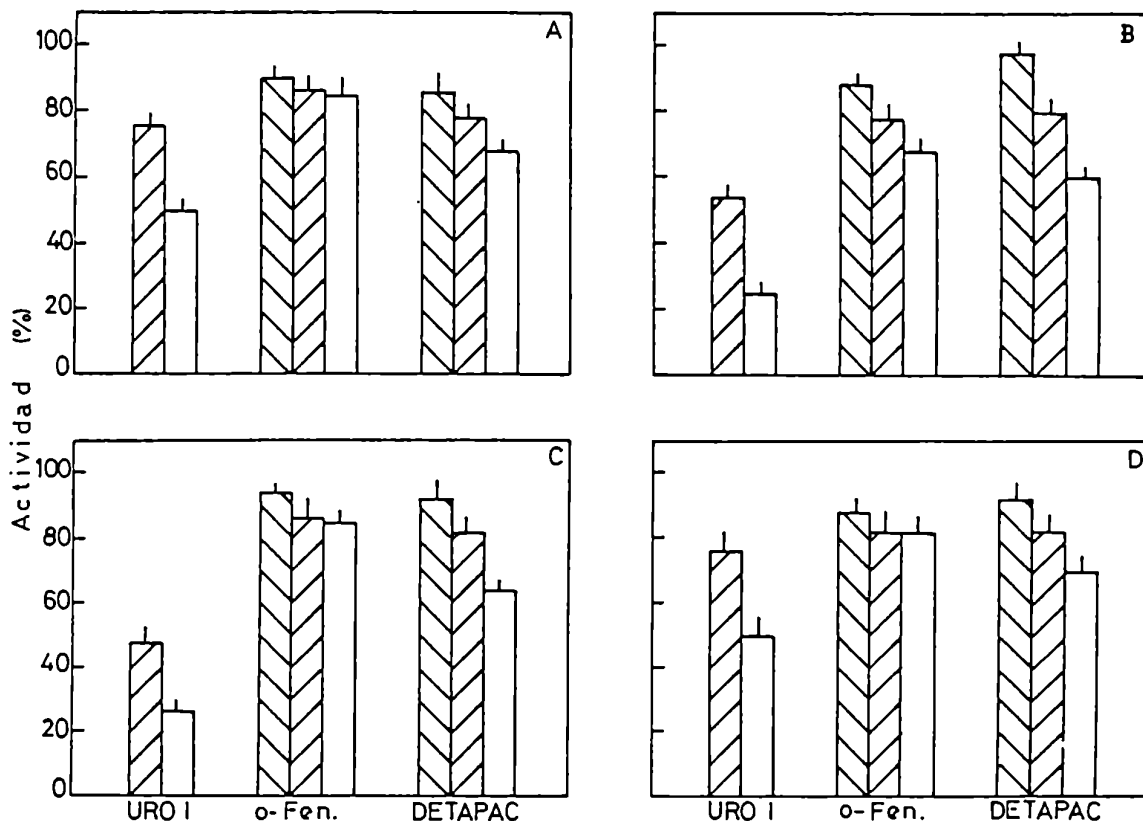


FIGURA III.10.: Efecto de la presencia de o-fenantrolina y DETAPAC sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D). Los hemolizados de GR se preincubaron durante 30 minutos a 0 °C en presencia de o-fenantrolina (15 mM) o DETAPAC (1 mM), luego se agregó URO I 10 μ M (A, B, C) ó 100 μ M (D) y se mantuvieron en oscuridad (\square) o bajo luz UV (\square) durante 2 horas a 37 °C. (\square) Controles en presencia de o-fenantrolina o DETAPAC, agregados al sistema de incubación de cada enzima. Otros detalles experimentales y los valores controles se indican en la leyenda de la Figura III.3.

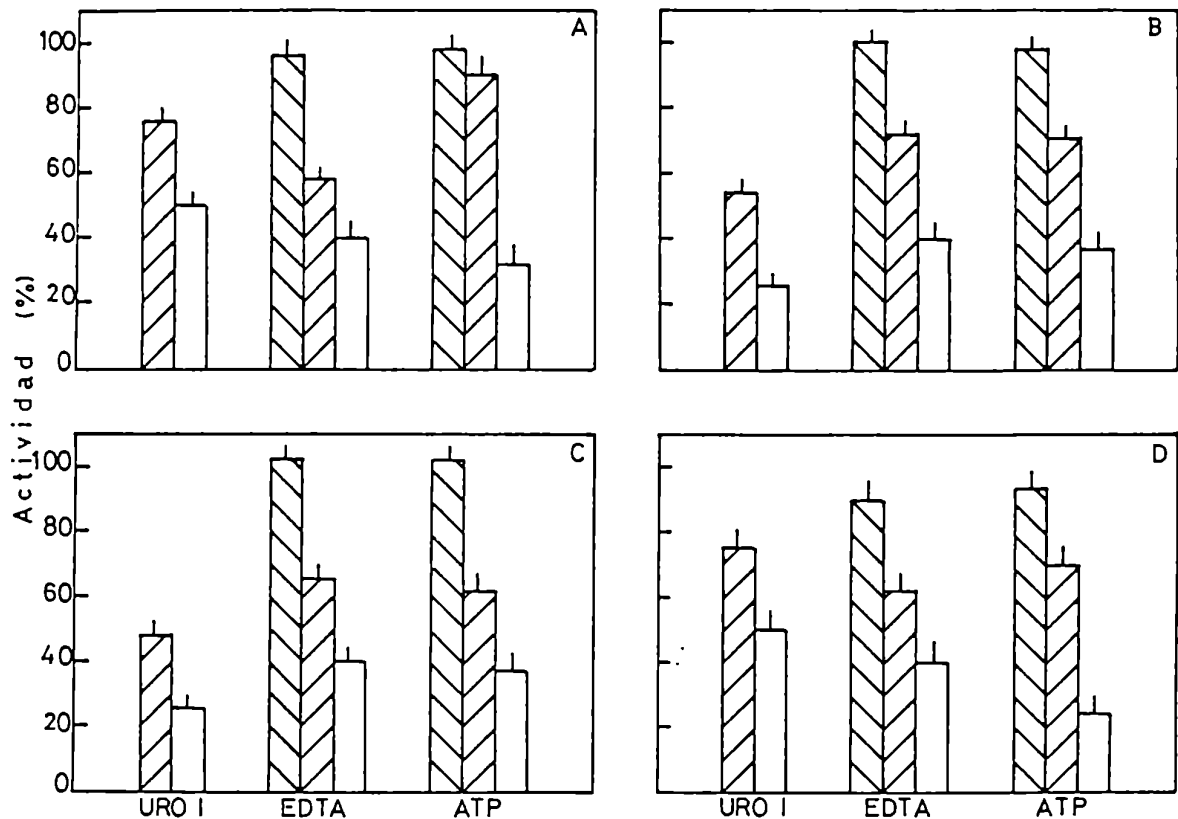


FIGURA III.11.: Efecto de la presencia de EDTA y ATP sobre la actividad enzimática de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D).

Los hemolizados de GR se preincubaron durante 30 minutos a 0 °C en presencia de EDTA (1 mM) o ATP (1 mM), luego se agregó URO I 10 μ M (A, B, C) ó 100 μ M (D) y se mantuvieron en oscuridad (▨) o bajo luz UV (□) durante 2 horas a 37 °C. (▨) Controles en presencia de EDTA o ATP agregados al sistema de incubación de cada enzima. Otros detalles experimentales y los valores controles se indican en la leyenda de la Figura III.3.

Por todo lo expuesto, se propone que el mecanismo para explicar la inactivación fotodinámica de las enzimas por la porfirina sería el indicado en la Figura III.12.

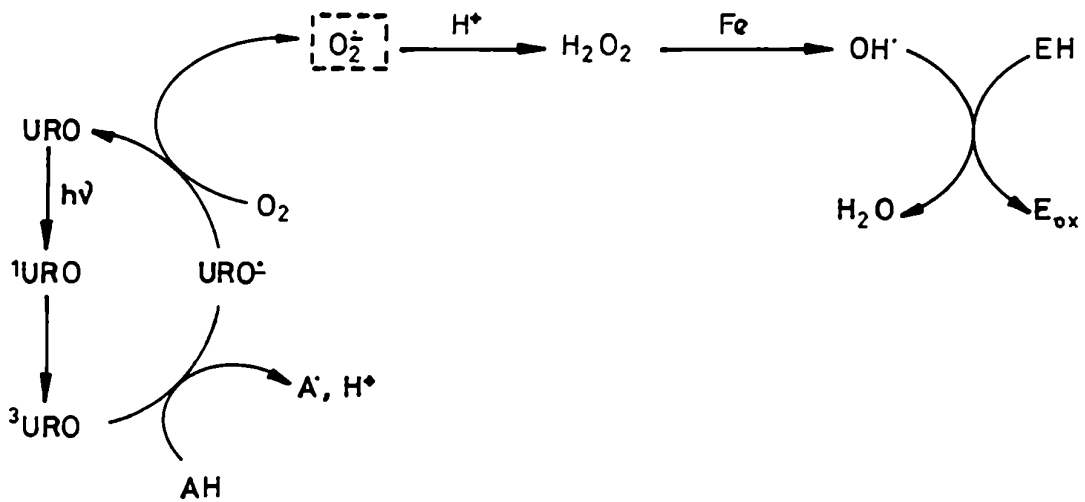


FIGURA III.12.: Mecanismo propuesto para explicar la acción fotodinámica de la URO sobre las enzimas.
 AH: dador de electrones; EH: enzima blanco; Eox: enzima oxidada

Al absorber un fotón, la URO pasa al estado excitado sin gulete (^1URO); el cruzamiento intersistema, con inversión de espín, da como resultado la porfirina en estado triplete (^3URO) de menor energía pero mayor vida media. La reacción tipo I es iniciada por la transferencia de un electrón desde un dador de electrones (AH) a la porfirina excitada, dando lugar a la formación del radical aniónico $\text{URO}^{\cdot-}$. Este radical aniónico, en presencia de oxígeno molecular, daría origen a la formación de peróxido de hidrógeno, retornando la porfirina a su estado energético basal. No se descarta la posibilidad de que la interacción del radical $\text{URO}^{\cdot-}$ con el oxígeno dé como producto el radical superóxido el cual, a su vez, originaría peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, en presencia de hierro (II), produce radicales hidroxilo, los que serían responsables de la oxidación de aminoácidos esenciales para

la actividad de las enzimas blanco (EH).

III.6. CONCLUSIONES

- Usando "scavengers" de distintas especies reactivas, se estudió el mecanismo de inactivación enzimática inducida por URO I:
 - . Empleando "scavengers" de 1O_2 , se comprobó que el mecanismo tipo II no sería la reacción preponderante que media el efecto de URO I.
 - . Se comprobó que la inactivación enzimática involucra transferencia de electrones, ya que los "scavengers" de electrones redujeron significativamente el efecto de URO I sobre ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D.
 - . La SOD no protegió la actividad de las enzimas estudiadas, por lo que no se pudo demostrar la presencia de $O_2^{\cdot-}$ en los sistemas investigados.
 - . El mecanismo de acción de URO I sobre las enzimas ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D involucraría las especies peróxido de hidrógeno y OH^{\cdot} , dado que las actividades enzimáticas fueron protegidas en presencia de catalasa, GSH, etanol, glucosa, DMSO, o-fenantrolina y DETAPAC, y fueron reducidas en presencia de EDTA y ATP.
- Se propone un mecanismo de acción en el cual se formaría peróxido de hidrógeno a partir de oxígeno y el radical aniónico $URO^{\cdot-}$. El peróxido de hidrógeno daría origen al OH^{\cdot} vía la reacción de Fenton, y este radical sería responsable de la oxidación de aminoácidos esenciales para la actividad enzimática de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D.

CAPITULO IV

CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA MOLECULAR PROTEICA POR EFECTO DE LA ACCION FOTODINAMICA Y NO FOTODINAMICA DE URO I

	Página
IV.1. Tratamiento de las enzimas purificadas	136
IV.2. Estudios químicos	137
IV.2.1. Determinación de grupos -SH totales	137
IV.2.2. Determinación de grupos amino libres	137
IV.3. Estudios espectroscópicos	141
IV.3.1. Espectros de absorción de ALA-D	141
IV.3.2. Espectros de absorción de PBGasa	146
IV.3.3. Espectros de absorción de deaminasa	149
IV.3.4. Espectros de absorción de URO-D	149
IV.4. Estudios electroforéticos	154
IV.4.1. Electroforesis de ALA-D	154
IV.4.2. Electroforesis de PBGasa	156
IV.4.3. Electroforesis de deaminasa	156
IV.4.4. Electroforesis de URO-D	159
IV.5. Conclusiones	161

IV. CAMBIOS EN LA ESTRUCTURA MOLECULAR PROTEICA POR EFECTO DE LA ACCION FOTODINAMICA Y NO FOTODINAMICA DE URO I

Cuando las proteínas son iluminadas con luz UV o visible, en presencia de un sensibilizador, se puede comprobar que ocurre fotooxidación de residuos aminoácido sensibles (cisteína, histidina, tirosina, metionina, triptofano) y "cross-linking" covalente de las cadenas peptídicas que conduce a la formación de agregados de alto peso molecular (de Goeij y col., 1975; Dubbelman y col., 1978; Girotti, 1979; Verweij y col., 1981; Verweij y van Steveninck, 1982). Se ha demostrado que el "cross-linking" no es un evento fotodinámico primario sino una reacción secundaria entre los productos de fotooxidación de los residuos aminoácido susceptibles y otros grupos de la molécula proteica (Dubbelman y col., 1980).

En el rango de pH 7,0 - 8,5 los grupos -SH de la proteína son los más sensibles a la fotooxidación, seguidos por histidina, triptofano y tirosina (van Steveninck y col., 1983). Sin embargo, la naturaleza química del "cross-linking" no puede atribuirse a la sola formación de puentes S-S ya que la reducción de estas uniones con ditiotreitól o ditióeritritól no disminuye la aparición de especies de alto peso molecular en la electroforesis (Girotti, 1976; Dubbelman y col., 1978; Verweij y van Steveninck, 1982; Vincent y col., 1986).

En modelos experimentales en los que se estudió la fotooxidación de distintos aminoácidos en presencia de restos amino marcados con ^{14}C , se obtuvieron nuevos productos marcados, generados por la reacción entre aminoácidos fotooxidados y la amina marcada (Dubbelman y col., 1975). Se observó que no había reacción entre las aminas marcadas y cisteína, metionina o aminoácidos no fotooxidables; en cambio sí se produjo reacción entre estas aminas y tirosina o triptofano, y la reacción fue mucho mayor con

histidina (Dubbelman y col., 1975, 1978). El rol crucial de los grupos amino libres en la reacción fue confirmado por la fuerte inhibición del "cross-linking" por succinilación de los grupos amino de distintas proteínas antes de la fotooxidación (Dubbelman y col., 1978).

Durante la fotooxidación de histidina se observó adición nucleofílica de grupos amino al anillo imidazol, y se comprobó que el tratamiento previo con hidroxilamina, un fuerte reactivo nucleofílico, impedía el "cross-linking" (Dubbelman y col., 1978). Estos resultados llevaron a postular un mecanismo molecular para el "cross-linking" en el que reaccionan un producto de fotooxidación de la histidina con un grupo amino de la proteína vía una adición nucleofílica (Verweij y van Steveninck, 1980).

Algunas proteínas, como la mioglobina, no presentaron la característica aparición de polímeros en electroforesis. Sin embargo, durante la fotooxidación se observó una significativa disminución de grupos amino libres. Esta disminución se adjudicó a la formación de "cross-linking" intramolecular entre estos grupos amino y residuos histidina fotooxidados (Verweij y col., 1981; Verweij y van Steveninck, 1982).

Teniendo en cuenta estos resultados y las reacciones propuestas, se decidió investigar la posible existencia de "cross-linking" y las modificaciones de grupos amino y -SH.

IV.1. TRATAMIENTO DE LAS ENZIMAS PURIFICADAS

Para estas experiencias se utilizaron enzimas parcialmente purificadas (Capítulo II, Materiales y Métodos), a las que se agregó URO I 10 μ M (ALA-D, PBGasa, deaminasa) ó 100 μ M (URO-D). El tratamiento se realizó en oscuridad o bajo luz UV durante 30, 60, 90 y 120 minutos.

En la Figura IV.1. se observa que la inactivación

enzimática es mucho mayor que la obtenida con los hemolizados de GR (Figura I.1., Capítulo I), aunque sigue un perfil similar. Estos resultados no son sorprendentes ya que es mayor la probabilidad de encuentro de las especies reactivas generadas *in situ* con sus moléculas blanco cuando las enzimas están parcialmente purificadas en comparación con una mayor dificultad de acceso cuando el blanco enzimático se encuentra en un pool multiproteico.

IV.2. ESTUDIOS QUIMICOS

Para los estudios químicos se utilizaron soluciones enzimáticas parcialmente purificadas y tratadas con URO I como se describió en el ítem anterior.

IV.2.1. Determinación de grupos -SH totales

Con el objeto de exponer todos los grupos -SH, las enzimas fueron tratadas con SDS antes de la reacción con DTNB.

La Figura IV.2. muestra la variación de los grupos -SH totales de las enzimas en función del tiempo de exposición a la porfirina. Se puede ver que después de 120 minutos en iluminación se ha perdido entre un 30 y un 60 % de los grupos -SH totales. En oscuridad, la disminución es similar a la obtenida bajo luz UV para cada enzima.

La pérdida de grupos -SH (Figura IV.2.) no sigue el perfil de inactivación de las enzimas, ni está en relación con la actividad final de cada una de ellas luego de 2 horas de tratamiento con URO I (Figura IV.1.).

IV.2.2. Determinación de grupos amino libres

La fluorescamina interactúa con los grupos amino primarios de las proteínas, dando derivados altamente fluorescentes;

la fluorescencia resultante es proporcional a la concentración de grupos amino libres presentes en el medio (Udenfriend y col., 1972).

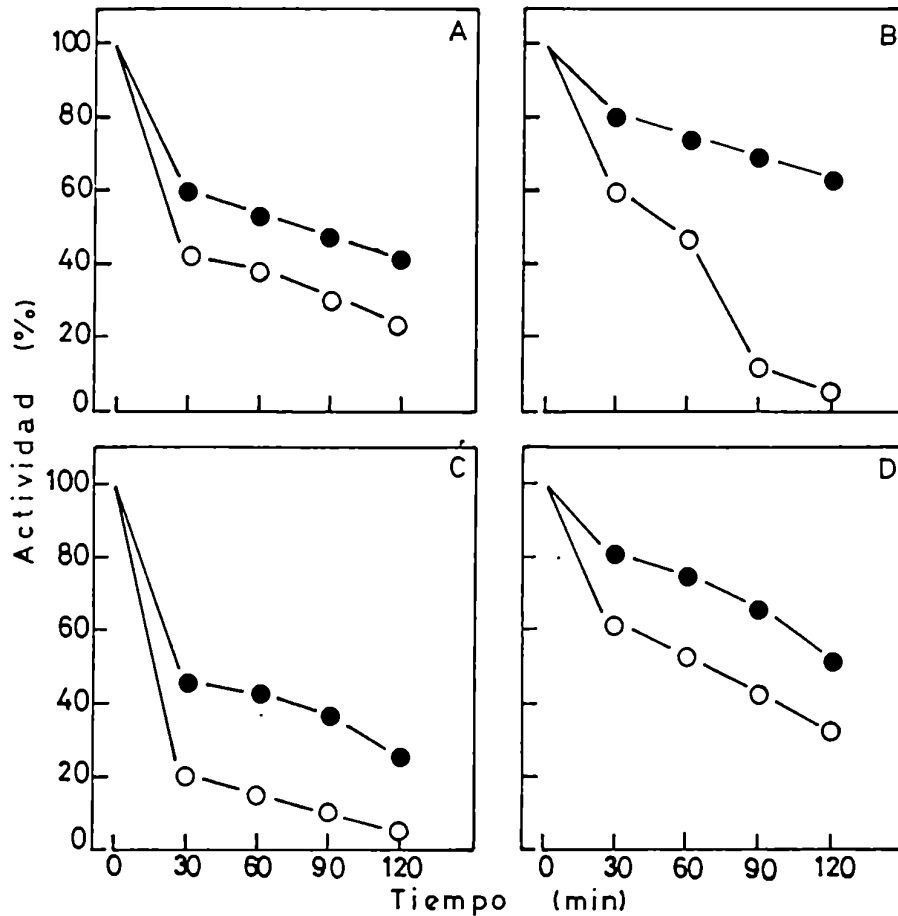


FIGURA IV.1.: Tratamiento de las enzimas purificadas con URO I. (A) ALA-D, (B) PBGasa, (C) deaminasa, (D) URO-D. Las enzimas parcialmente purificadas de GR fueron tratadas con URO I $10 \mu\text{M}$ (A, B, C) ó $100 \mu\text{M}$ (D) y se mantuvieron en oscuridad (●) o bajo luz UV (○) durante 30, 60, 90 y 120 minutos a 37°C . Los valores presentados se expresan como porcentaje de las actividades específicas control correspondientes a las enzimas parcialmente purificadas y sin otro tratamiento. Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

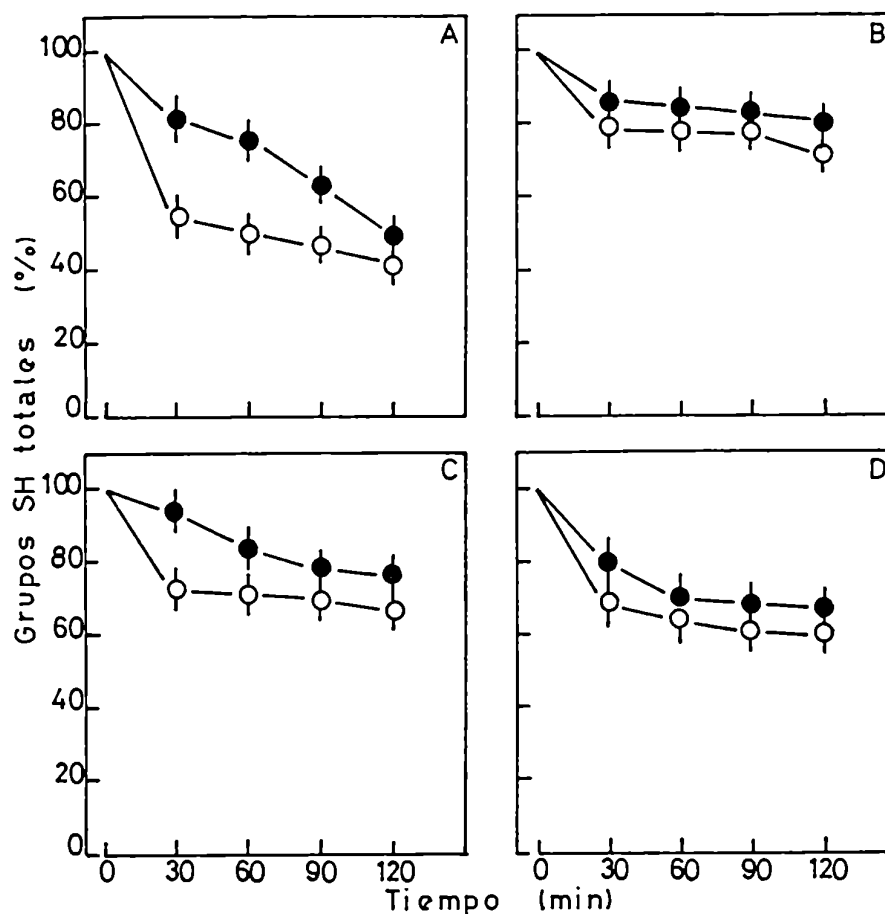


FIGURA IV.2.: Variación de los grupos -SH totales de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D). 0,12 mg de cada una de las enzimas parcialmente purificadas de GR y expuestas a URO I 10 μ M (A, B, C) ó 100 μ M (D) durante 30, 60, 90 y 120 minutos en oscuridad (●) o bajo luz UV (○), fueron tratadas con SDS; luego se hicieron reaccionar con DTNB y se leyó la absorbancia a 410 nm. Los valores presentados se expresan como porcentaje con respecto a los correspondientes controles sin tratamiento con URO I, y representan el promedio \pm DS de 3 experiencias realizadas por duplicado. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

Las enzimas parcialmente purificadas y expuestas a URO I fueron tratadas con fluorescamina, luego se midió la fluorescencia y se comparó con la de los respectivos controles que no fueron expuestos a la porfirina.

Se observó una disminución de los grupos amino libres; en iluminación esta reducción es similar para todas las enzimas a los 120 minutos de tratamiento (30 - 40 %) y es mayor que la observada en oscuridad (Figura IV.3.). Nuevamente, la pérdida de grupos amino libres no está en relación con la actividad final de cada una de las enzimas luego de 2 horas de exposición a la URO I.

Los resultados hasta aquí obtenidos sugieren que probablemente los grupos -SH sean más afectados que los grupos amino por la presencia de URO I en oscuridad, mientras que los grupos amino estarían más afectados por las reacciones fotooxidativas y el "cross-linking" inter o intrapeptídico inducido por la porfirina en iluminación.

Se podría pensar que la falta de relación entre el grado de inactivación (Figura IV.1.) y el porcentaje de disminución de grupos -SH y amino (Figuras IV.2. y IV.3.) se debe al diferente grado de purificación de las enzimas. Sin embargo, ALA-D (78 % de inactivación) y PBGasa (96 % de inactivación) (Figura IV.1. A, B) tenían una purificación del mismo orden (121 veces y 470 veces respectivamente (Tablas II.1. y II.2., Materiales y Métodos); lo mismo ocurrió con deaminasa (97 % de inactivación) y URO-D (65 % de inactivación) (Figura IV.1. C, D) que habían sido purificadas 1.071 y 1.045 veces respectivamente (Tablas II.3. y II.4., Materiales y Métodos). Por lo tanto esta justificación es improbable, aunque no puede descartarse totalmente.

Si suponemos que, en el caso de PBGasa y deaminasa están involucrados en las reacciones fotooxidativas y de "cross-linking" una mayor proporción de grupos -SH y amino esenciales para la actividad enzimática que los no esenciales, mientras que para ALA-D

y URO-D esta proporción es inversa, a igual porcentaje de grupos amino bloqueados obtendríamos mayor inactivación de las dos primeras enzimas que de las últimas, lo cual estaría de acuerdo con los resultados obtenidos.

IV.3. ESTUDIOS ESPECTROSCOPICOS

Para los estudios espectroscópicos se utilizaron soluciones enzimáticas parcialmente purificadas y tratadas con URO I como se describió en el ítem IV.1.

Previamente se hizo el espectro de absorción de los aminoácidos fotosensibles. Cistina, metionina, histidina y cisteína presentan un único pico de absorción a 220 nm, 230 nm, 232 nm y 244 nm respectivamente (Figura IV.4. A, B, C, D); tirosina presenta tres picos de absorción a 232 nm, 268 nm y 280 nm (Figura IV.4. E), y triptofano presenta 2 picos de absorción a 246 nm y 280 nm (Figura IV.4. F).

IV.3.1. Espectros de absorción de ALA-D

La Figura IV.5. A muestra el espectro de absorción de ALA-D parcialmente purificada. El espectro de la enzima tratada con URO I 10 μ M en oscuridad presenta variaciones en la zona de 210 - 230 nm y 250 - 280 nm, observándose en esta última zona las modificaciones más pronunciadas. Estas variaciones son importantes a los 30 minutos de tratamiento (Figura IV.5. B) y aumentan progresivamente con el tiempo de contacto de la enzima con la porfirina (Figura IV.5. C, D, E).

En la Figura IV.6. se muestra el espectro de absorción del ALA-D parcialmente purificada (Figura IV.6. A) y luego tratada con URO I 10 μ M y luz UV (Figura IV.6. B, C, D, E). El espectro de absorción presenta variaciones en la zona de 210 - 230 nm y 250 - 280 nm, algo mayores que las mostradas por la enzima tratada con porfirina en oscuridad (Figura IV.5.).

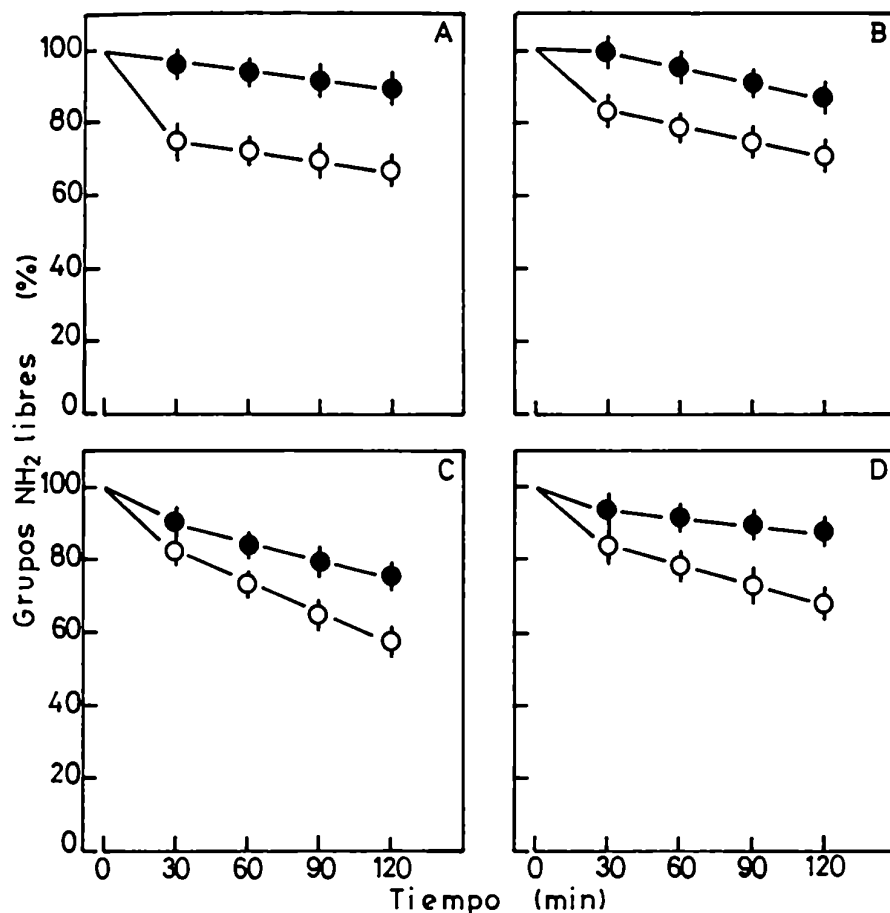


FIGURA IV.3.: Variación de los grupos amino libres de ALA-D (A), PBGasa (B), deaminasa (C) y URO-D (D). 12 μ g de cada una de las enzimas parcialmente purificadas de GR y expuestas a URO I 10 μ M (A, B, C) ó 100 μ M (D) durante 30, 60, 90 y 120 minutos en oscuridad (●) o bajo luz UV (○) se hicieron reaccionar con fluorescamina y se determinó la fluorescencia relativa ($\lambda_{excitación}$: 375 nm, $\lambda_{emisión}$: 475 nm). Los valores presentados se expresan como porcentaje con respecto a los correspondientes controles sin tratamiento con URO I, y representan el promedio \pm DS de 3 experiencias realizadas por duplicado. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

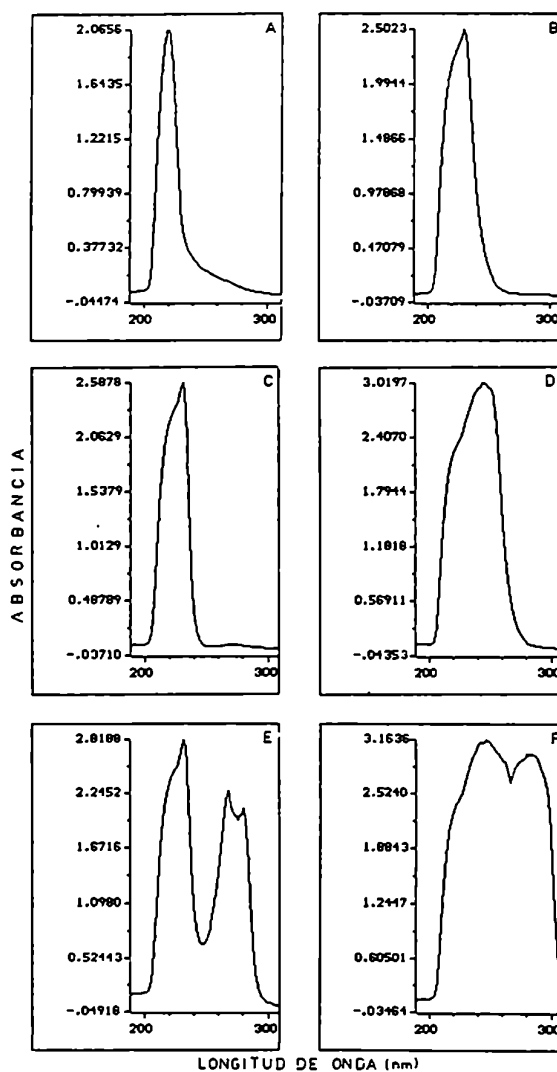


FIGURA IV.4.: Espectro de absorción de aminoácidos fotosensibles. (A) Cistina, (B) metionina, (C) histidina, (D) cisteína, (E) tiro_sina, (F) triptofano. Los aminoácidos se disolvieron en buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 6,8 y se determinaron los espectros de absorción entre 190 y 310 nm.

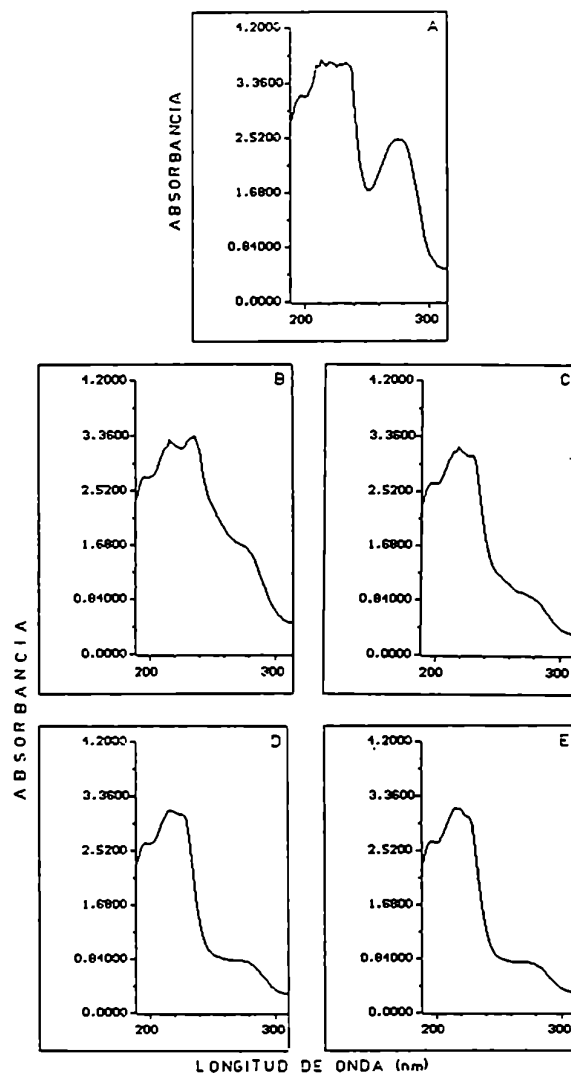


FIGURA IV.5.: Espectro de absorción de ALA-D tratada con URO I en oscuridad. Se prepararon soluciones de 1 mg/ml de ALA-D parcialmente purificada y sin tratamiento posterior (A) o tratada con URO I 10 μ M en oscuridad durante 30 (B), 60 (C), 90 (D) y 120 (E) minutos; y se determinaron los espectros de absorción entre 190 y 310 nm.

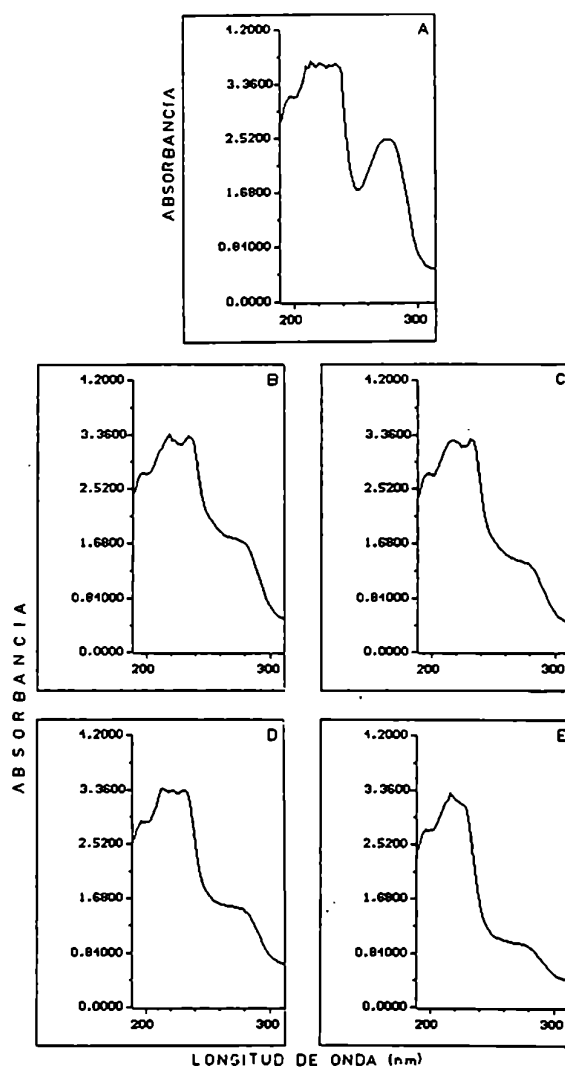


FIGURA IV.6.: Espectro de absorción de ALA-D tratada con URO I y luz UV. Se prepararon soluciones de 1 mg/ml de ALA-D parcialmente purificada y sin tratamiento posterior (A) o tratada con URO I 10 μ M y luz UV durante 30 (B), 60 (C), 90 (D) y 120 (E) minutos; y se determinaron los espectros de absorción entre 190 y 310 nm.

Las mayores alteraciones se observan en la zona del espectro donde la absorbancia de tirosina y triptofano es máxima (250 - 280 nm) (Figura IV.4. E, F), y son similares para la enzima tratada con URO I en luz y en oscuridad (Figuras IV.5. y IV.6.). Las modificaciones del espectro en la región de 220 - 230 nm coinciden con la zona de máxima absorbancia de cistina, metionina e histidina (Figura IV.4. A, B, C). Estas variaciones son mayores para el ALA-D expuesta a la porfirina durante 30, 60 y 90 minutos en presencia de luz UV que para la enzima tratada con URO I en oscuridad durante los mismos períodos de tiempo, pero la absorbancia alcanzó valores similares luego de 2 horas de tratamiento tanto en oscuridad como en luz UV (Figuras IV.5. y IV. 6). Considerando que también la disminución de grupos -SH totales es similar para la enzima tratada en luz u oscuridad durante 2 horas (Figura IV.2. A), mientras que la pérdida de grupos amino libres es mayor para el ALA-D iluminada en presencia de URO I que para la expuesta a la porfirina en oscuridad (Figura IV.3. A), podemos suponer que las diferencias en la inactivación enzimática (Figura IV.1. A) estarían dadas por la diferente cantidad de grupos amino bloqueados en ambas condiciones lumínicas.

IV.3.2. Espectros de absorción de PBGasa

Las Figuras IV.7. A y IV.8. A muestran el espectro de absorción de PBGasa parcialmente purificada. El espectro de la enzima tratada en oscuridad con URO I 10 μ M presenta ligeras variaciones en la región de 220 - 240 nm (Figura IV.7.), mientras que, para la enzima expuesta a la porfirina y a la luz UV, se observa una alteración mayor en esta región, además de variaciones en la zona de 260 - 280 nm (Figura IV.8.).

Las modificaciones del espectro de absorción de la enzima iluminada en presencia de URO I coinciden con las zonas de máxima absorción de los aminoácidos fotosensibles (Figura IV.4.) y podría deberse a alteraciones de éstos por fotooxidación.

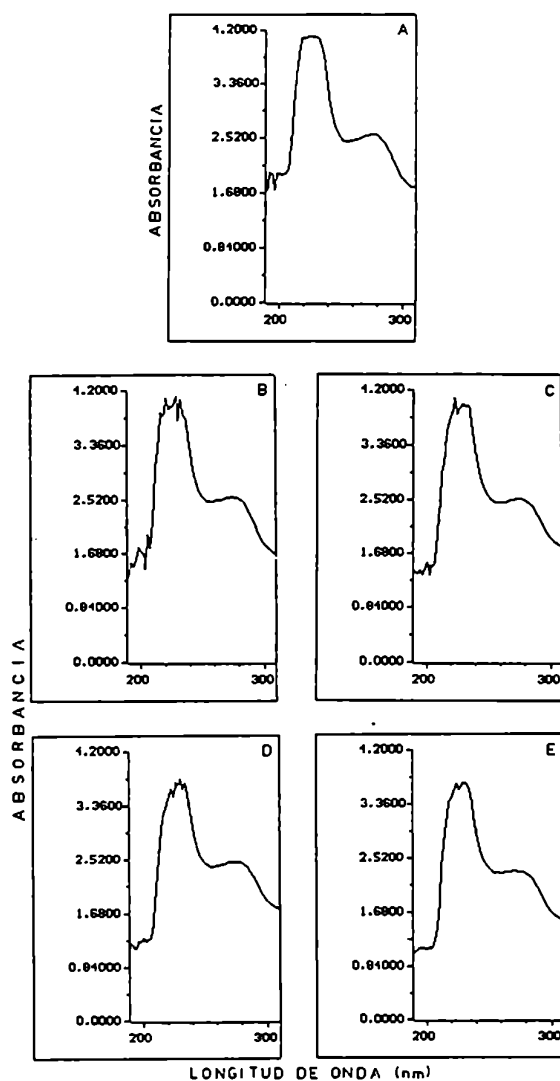


FIGURA IV.7.: Espectro de absorción de PBGasa tratada con URO I en oscuridad. Se prepararon soluciones de 1 mg/ml de PBGasa parcialmente purificada y sin tratamiento posterior (A) o tratada con URO I 10 μ M en oscuridad durante 30 (B), 60 (C), 90 (D) y 120 (E) minutos; y se determinaron los espectros de absorción entre 190 y 310 nm.

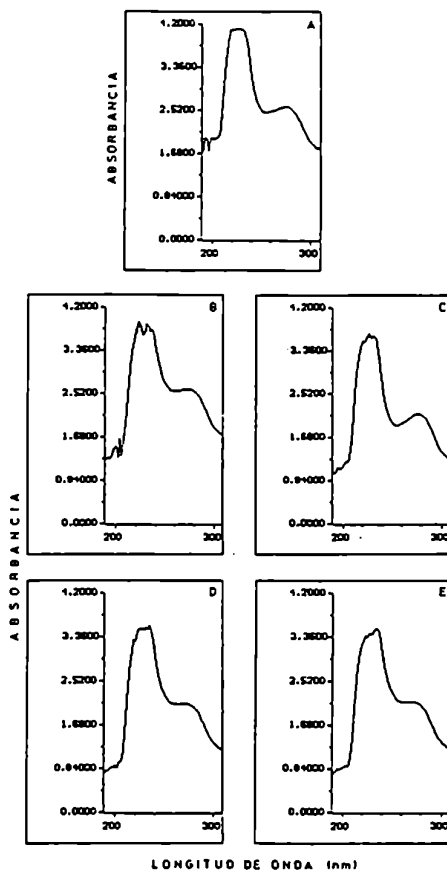


FIGURA IV.8.: Espectro de absorción de PBGasa tratada con URO I y luz UV. Se prepararon soluciones de 1 mg/ml de PBGasa parcialmente purificada y sin tratamiento posterior (A) o tratada con URO I 10 μ M y luz UV durante 30 (B), 60 (C), 90 (D) y 120 (E) minutos; y se determinaron los espectros de absorción entre 190 y 310 nm.

IV.3.3. Espectros de absorción de deaminasa

El espectro de absorción de deaminasa parcialmente purificada se muestra en las Figuras IV.9 A y IV.10. A. Cuando la enzima fue tratada con URO I 10 μ M en oscuridad, su espectro presentó una reducción de la absorción en la zona de 220 - 240 nm (Figura IV.9.). La absorción en esta región del espectro se redujo más aún cuando la enzima fue iluminada con luz UV en presencia de la porfirina (Figura IV.10.). En ambos casos se observaron muy ligeras modificaciones del espectro de absorción en la zona de 280 nm.

Las variaciones en la absorbancia alrededor de los 230 nm coinciden con la inactivación de la enzima (Figura IV.1. C), y podrían ser el resultado de alteraciones en la absorción de histidina, cuyo pico de absorción se encuentra a 232 nm (Figura IV.4.).

IV.3.4. Espectros de absorción de URO-D

El espectro de absorción de URO-D parcialmente purificada se muestra en las Figuras IV.11. A y IV.12. A. La enzima presentó un pico de absorción en la zona de 220 nm que se redujo ligeramente cuando la URO-D fue tratada con URO I 100 μ M en oscuridad (Figura IV.11.). La disminución de la absorción a 220 nm fue algo mayor cuando la enzima se expuso a la luz UV en presencia de la porfirina (Figura IV.12.).

La cistina presenta un pico de absorción a 220 nm (Figura IV.4. A), y se podría suponer que las variaciones en el espectro de URO-D se deben a alteraciones de este aminoácido. Sin embargo, como las modificaciones de la cistina no se pueden correlacionar con la pérdida de grupos -SH (Figura IV.2.) ni de grupos amino (Figura IV.3.), es de suponer que este aminoácido no es el principal responsable de la inactivación de URO-D.

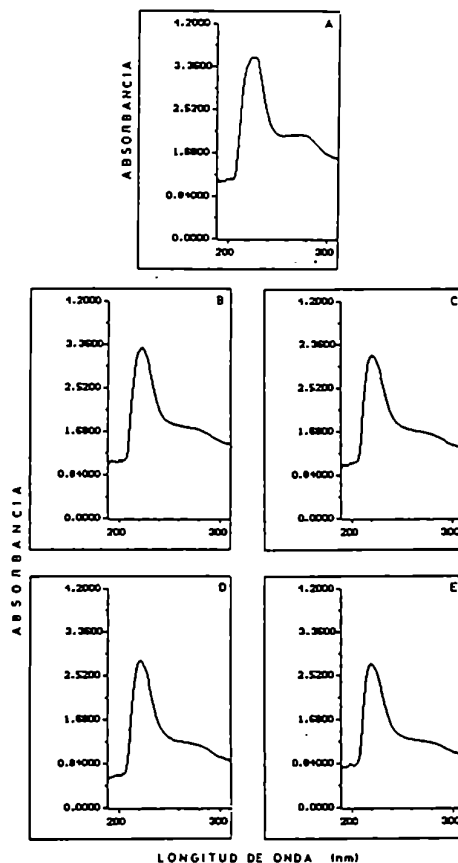


FIGURA IV.9.: Espectro de absorción de deaminasa tratada con URO I en oscuridad.

Se prepararon soluciones de 1 mg/ml de deaminasa parcialmente purificada y sin tratamiento posterior (A) o tratada con URO I 10 M en oscuridad durante 30 (B), 60 (C), 90 (D) y 120 (E) minutos; y se determinaron los espectros de absorción entre 190 y 310 nm.

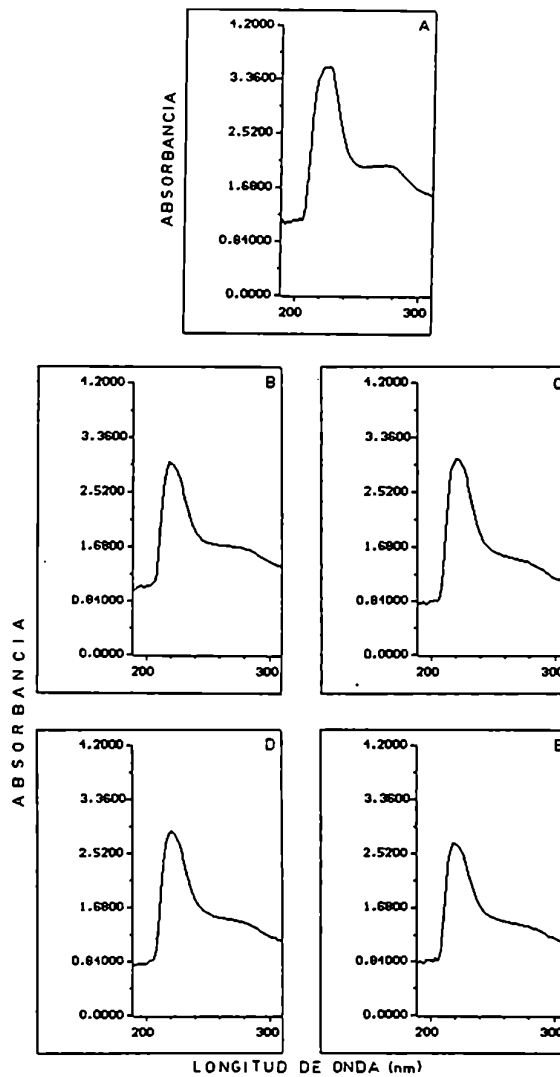


FIGURA IV.10.: Espectro de absorción de deaminasa tratada con URO I y luz UV.

Se prepararon soluciones de 1 mg/ml de deaminasa parcialmente purificada y sin tratamiento posterior (A) o tratada con URO I $10 \mu\text{M}$ y luz UV durante 30 (B), 60 (C), 90 (D) y 120 (E) minutos; y se determinaron los espectros de absorción entre 190 y 310 nm.

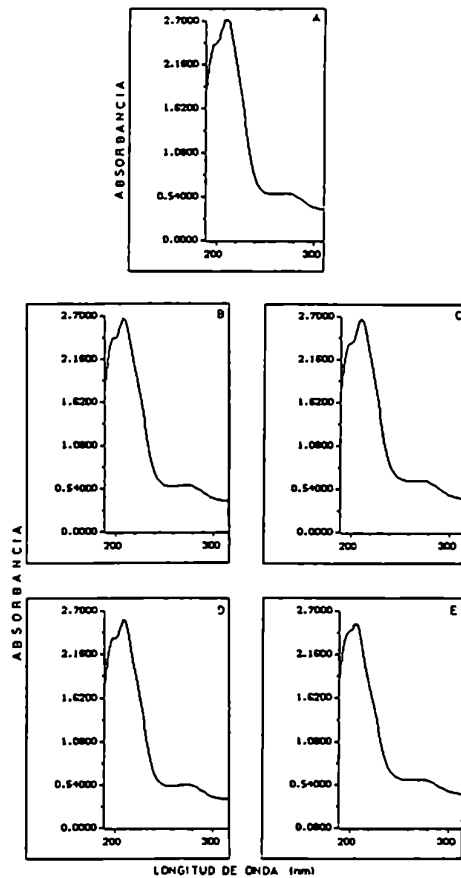


FIGURA IV.11.: Espectro de absorción de URO-D tratada con URO I en oscuridad. Se prepararon soluciones de 1,3 mg/ml de URO-D parcialmente purificada y sin tratamiento posterior (A) o tratada con URO I 100 μ M en oscuridad 30 (B), 60 (C), 90 (D) y 120 (E) minutos; y se determinaron los espectros de absorción entre 190 y 310 nm.

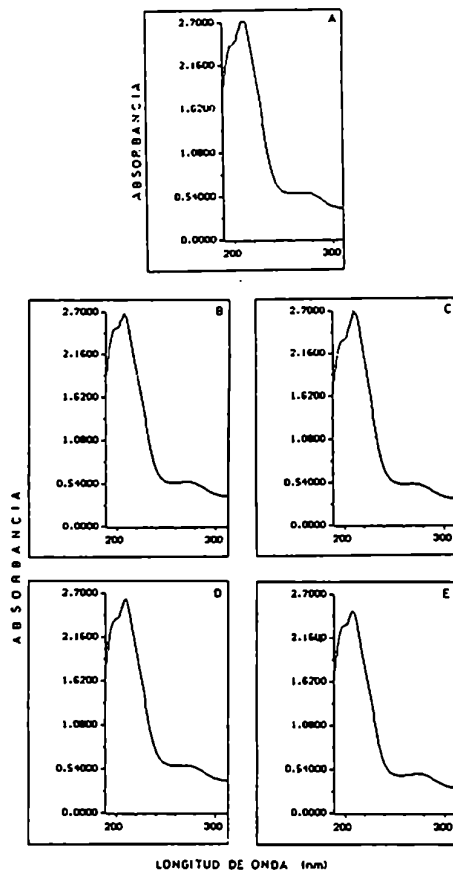


FIGURA IV.12.: Espectro de absorción de URO-D tratada con URO I y luz UV. Se prepararon soluciones de 1,3 mg/ml de URO-D parcialmente purificada y sin tratamiento posterior (A) o tratada con URO I 100 μ M y luz UV durante 30 (B), 60 (C), 90 (D) y 120 (E) minutos; y se determinaron los espectros de absorción entre 190 y 310 nm.

IV.4. ESTUDIOS ELECTROFORETICOS

Las enzimas parcialmente purificadas y tratadas con URO I, como se describió en el ítem IV.1., fueron sometidas a electroforesis.

IV.4.1. Electroforesis de ALA-D

La electroforesis de ALA-D parcialmente purificada y sin tratamiento presentó una única banda de peso molecular aparente 67.000 daltons (Figura IV.13., calle 2, banda a), que correspondería a la forma dimérica de la enzima (Anderson y Desnick, 1979). Cuando la enzima fue tratada durante 30, 60 y 90 minutos con URO I 10 μ M en oscuridad, la electroforesis presentó una banda única de peso molecular aparente 80.000 daltons (Figura IV.13., calles 3, 5 y 7, banda b), mientras que la enzima expuesta a la porfirina durante 120 minutos presentó esta única banda con peso molecular aparente 86.000 daltons (Figura IV.13., calle 9, banda c). La electroforesis del ALA-D iluminada con luz UV en presencia de URO I durante 30 y 60 minutos presentó una única banda en la misma posición que la enzima tratada en oscuridad (Figura IV.13., calles 4 y 6, banda b), pero cuando la enzima fue expuesta a la porfirina y luz UV durante 90 y 120 minutos, la electroforesis presentó dos bandas de proteína de peso molecular aparente 86.000 y 100.000 daltons (Figura IV.13., calles 8 y 10, bandas c y d).

Dada la pequeña diferencia de pesos moleculares aparentes, no podemos atribuir las bandas presentadas en la electroforesis a la formación de agregados moleculares. Sin embargo, la pérdida de grupos -SH totales (Figura IV.2. A) y de grupos amino libres (Figura IV.3. A) sugiere la formación de algún tipo de "cross-linking"; la electroforesis de ALA-D (Figura IV.13.) sugiere que éste podría ser intrapeptídico, produciendo modificaciones estructurales en la molécula de ALA-D que reducen su actividad enzimática. La movilidad electroforética es proporcional al radio

molecular de la proteína (Sargent, 1969) y una alteración en la forma de la molécula, produciría cambios en la movilidad y en su peso molecular aparente.

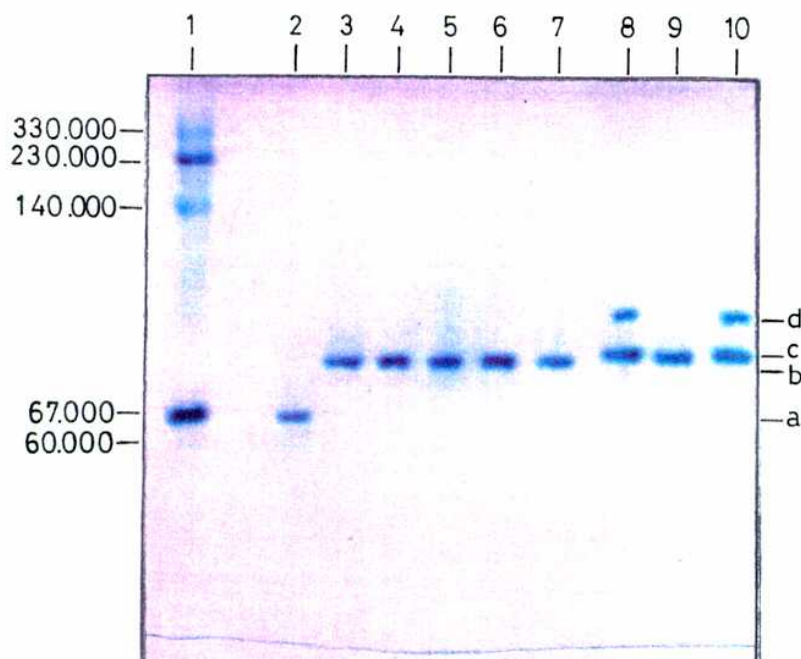


FIGURA IV.13.: Electroforesis de ALA-D en gel de poliacrilamida.

Calle 1: marcadores de peso molecular: catalasa monómero (60.000 daltons), albúmina (67.000 daltons), LDH tetrámero (140.000 daltons), catalasa tetrámero (230.000 daltons), tiroglobulina (330.000 daltons).

Calle 2: ALA-D parcialmente purificada

Calles 3, 5, 7 y 9: ALA-D parcialmente purificada y tratada con URO I $10 \mu\text{M}$, en oscuridad durante 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente.

Calles 4, 6, 8 y 10: ALA-D parcialmente purificada y tratada con URO I $10 \mu\text{M}$ y luz UV durante 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente. Se aplicaron $50 \mu\text{g}$ /calle de las proteínas descritas, previamente tratadas con SDS.

Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

IV.4.2. Electroforesis de PBGasa

La electroforesis de la PBGasa parcialmente purificada y sin ningún tratamiento presentó dos bandas de peso molecular aparente 28.000 daltons y 36.000 daltons (Figura IV.14., calle 2, bandas a y b), que corresponderían a isomerasa y deaminasa respectivamente. Se ha reportado un peso molecular de 29.500 daltons para la isomerasa de GR humanos, dato obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (Tsai y col., 1987), y de 28.600 daltons para la enzima de la misma fuente, obtenido por secuenciación de sus aminoácidos (Tsai y col., 1988). El peso molecular de la deaminasa de GR humanos, obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS, es de 37.000 daltons (Anderson y Desnick, 1980).

La PBGasa tratada con URO I 10 μ M, en oscuridad o bajo luz UV, presentó una única banda de peso molecular aparente de 36.000 daltons (Figura IV.14, calles 3-10, banda b).

Nuevamente en este caso los datos obtenidos en la determinación de grupos -SH totales (Figura IV.2. B) y grupos amino libres (Figura IV.3. B) sugieren que la exposición a la URO I produce algún tipo de "cross-linking", y la electroforesis de la PBGasa (Figura IV.14.) estaría indicando que el "cross-linking" sería intrapeptídico.

El tratamiento con URO I produciría alteraciones estructurales de la isomerasa que retrasarían su movilidad electroforética haciéndola coincidir con la banda de deaminasa. Las modificaciones estructurales de la deaminasa no alterarían su movilidad electroforética, aunque sí inhiben la actividad del complejo enzimático.

IV.4.3. Electroforesis de deaminasa

La electroforesis de la deaminasa parcialmente purificada y sin ningún tratamiento presentó una banda única de peso

molecular aparente 36.000 daltons (Figura .V.15., calle 2). El tratamiento de la enzima con URO I $10 \mu\text{M}$, en oscuridad o bajo luz UV, no produjo alteraciones en la movilidad electroforética (Figura IV.15., calles 3-10).

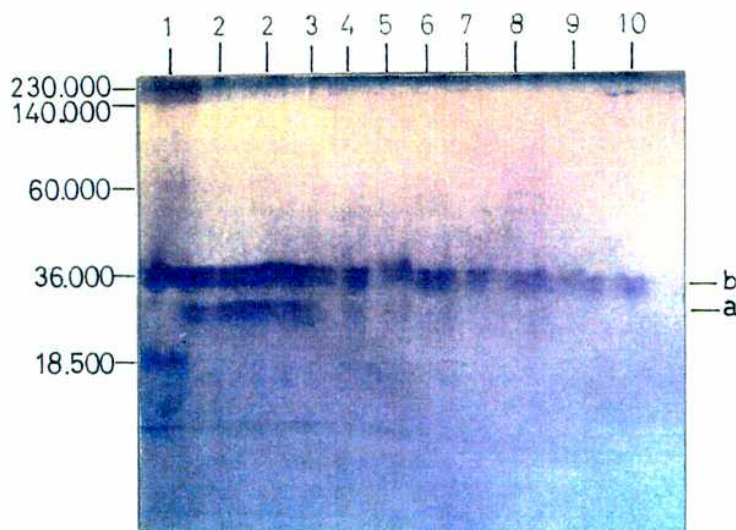


FIGURA IV.14.: Electroforesis de PBGasa en gel de poliacrilamida.
 Calle 1: marcadores de peso molecular: ferritina monómero (18.500 daltons), LDH monómero (36.000 daltons), catalasa monómero (60.000 daltons), LDH tetrámero (140.000 daltons), catalasa tetrámero (230.000 daltons).
 Calle 2: PBGasa parcialmente purificada.
 Calles 3, 5, 7 y 9: PBGasa parcialmente purificada y tratada con URO I $10 \mu\text{M}$ en oscuridad, durante 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente.
 Calles 4, 6, 8 y 10: PBGasa parcialmente purificada y tratada con URO I $10 \mu\text{M}$ y luz UV durante 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente.
 Se aplicaron $50 \mu\text{g}$ /calle de las proteínas descritas, previamente tratadas con SDS. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

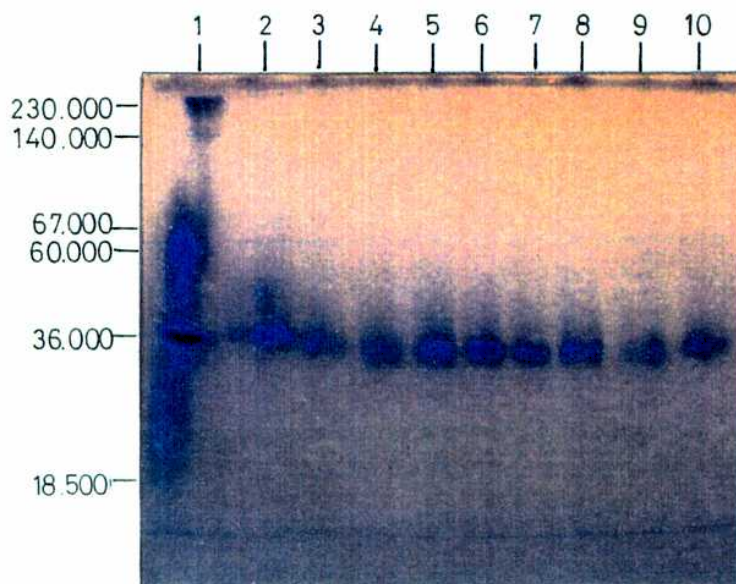


FIGURA IV.15.: Electroforesis de deaminasa en gel de poliacrilamida.

Calle 1: marcadores de peso molecular: feritina monómero (18.500 daltons), LDH monómero (36.000 daltons), catalasa monómero (60.000 daltons), albúmina (67.000 daltons), LDH tetrámero (140.000 daltons), catalasa tetrámero (230.000 daltons).

Calle 2: deaminasa parcialmente purificada.
Calle 3, 5, 7 y 9: deaminasa parcialmente purificada y tratada con URO I $10 \mu\text{M}$, en oscuridad, durante 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente.

Calle 4, 6, 8 y 10: deaminasa parcialmente purificada y tratada con URO I $10 \mu\text{M}$ y luz UV durante 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente.

Se aplicaron $50 \mu\text{g}$ /calle de las proteínas descritas, previamente tratadas con SDS. Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

La pérdida de grupos -SH totales y grupos amino libres por tratamiento de la deaminasa con URO I (Figura IV.2. C y IV.3. C) sugiere la formación de "cross-linking" que, según este trabajo (Figura IV.15.), no sería entonces interpeptídico sino intrapeptídico.

Comparando las electroforesis de deaminasa (Figura IV.15.) y de PBGasa (Figura IV.14.), vemos que la deaminasa, tras el tratamiento con URO I en oscuridad o bajo luz UV, muestra un comportamiento electroforético similar cuando está pura y cuando se encuentra formando parte del complejo PBGasa.

IV.4.4. Electroforesis de URO-D

La electroforesis de URO-D parcialmente purificada y sin ningún tratamiento presentó una banda única de peso molecular aparente 37.000 daltons (Figura IV.16., calle 2, banda a). El peso molecular de URO-D de GR humanos, obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y por isoelectroenfoque es de 39.000 daltons (Elder y col., 1983).

La enzima tratada con URO I 100 μ M presentó la misma banda de peso molecular aparente 37.000 daltons, que fue perdiendo intensidad en función del tiempo de contacto con la porfirina, a medidada que aumenta la intensidad de una segunda banda de peso molecular 63.000 daltons (Figura IV.16., calles 3-10, bandas a y b).

Dada la diferencia de pesos moleculares aparentes, no podemos pensar que las bandas obtenidas por electroforesis correspondan a la formación de agregados moleculares. Sin embargo, los datos obtenidos al determinar grupos -SH totales (Figura IV.2. D) y grupos amino libres (Figura IV.3. D), sugieren la formación de algún tipo de "cross-linking". La electroforesis de URO-D (Figura IV.16.) indica que el "cross-linking" sería intrapeptídico, produciendo modificaciones estructurales de la molécula que reducen la actividad enzimática y alteran su movilidad electroforética.

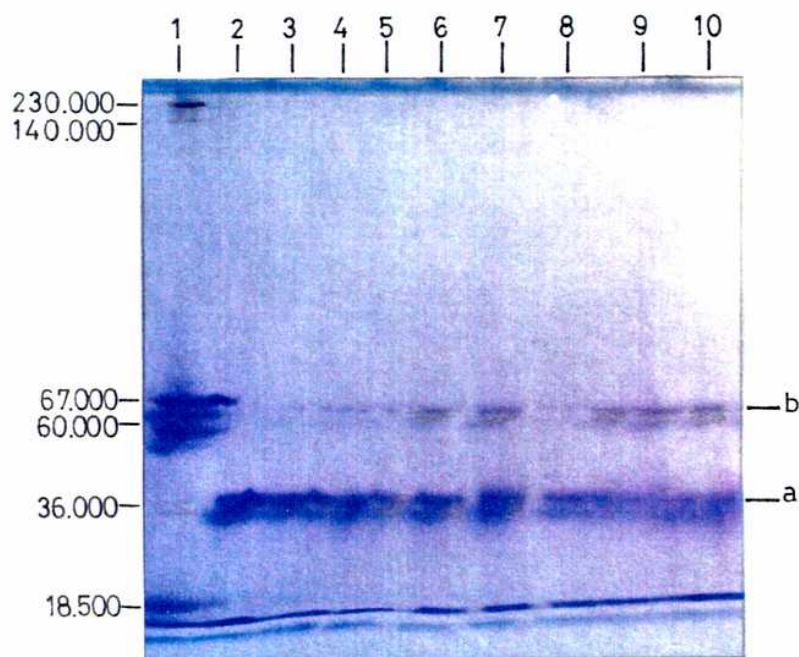


FIGURA IV.16.: Electroforesis de URO-D en gel de poliacrilamida.

Calle 1: marcadores de peso molecular: ferritina monómero (18.500 daltons), LDH monómero (36.000 daltons), catalasa monómero (60.000 daltons), albúmina (67.000 daltons), LDH tetrámero (140.000 daltons), catalasa tetrámero (230.000 daltons).

Calle 2: URO-D parcialmente purificada.

Calles 3, 5, 7 y 9: URO-D parcialmente purificada y tratada con URO I 100 μ M, en oscuridad, durante 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente.

Calles 4, 6, 8 y 10: URO-D parcialmente purificada y tratada con URO I 100 μ M y luz UV durante 30, 60, 90 y 120 minutos respectivamente.

Se aplicaron 50 μ g/calle de las proteínas descritas, previamente tratadas con SDS.

Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

IV.5. CONCLUSIONES

- Se estudió el efecto de URO I sobre ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D parcialmente purificadas de eritrocitos humanos. Se encontró una inactivación mucho mayor que la obtenida al tratar los hemolizados de GR con igual concentración de porfirina.
- Se determinó la variación de grupos -SH totales y de grupos amino libres de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D en función del tiempo de contacto con URO I.

. Las enzimas parcialmente purificadas y tratadas con URO I perdieron entre 30 y 60 % de sus grupos -SH totales luego de 2 horas de contacto con la porfirina, ya sea en oscuridad o bajo luz UV.

. La disminución de grupos amino libres fue mayor cuando las enzimas fueron expuestas a URO I y luz UV que cuando se las trató con la porfirina en oscuridad.

. Los grupos -SH serían más afectados por la presencia de URO I mientras que los grupos amino serían más afectados por las reacciones fotooxidativas.

Se observó que la pérdida de grupos -SH y amino no se correlaciona con la pérdida de actividad enzimática. Esto se debería a que, en el caso de PBGasa y deaminasa, habría una mayor proporción de grupos -SH y amino esenciales para la actividad enzimática involucrados en las reacciones fotooxidativas, mientras que, en el caso de ALA-D y URO-D, sería mayor la proporción de grupos no esenciales afectados por estas reacciones.

- Las enzimas parcialmente purificadas y tratadas con URO I mostraron variaciones en sus espectros de absorción en función del tiempo de exposición a la porfirina.

El espectro de absorción de ALA-D mostró importantes variaciones en la zona de absorción de tirosina y triptofano, que

fueron similares para la enzima tratada con URO I en oscuridad o bajo luz UV. Las modificaciones del espectro en la región de absorción de cistina, metionina e histidina fueron mayores para el ALA-D expuesta a URO I y luz UV durante 30, 60 y 90 minutos pero, a los 120 minutos de tratamiento, los valores de absorbancia fueron similares para la enzima tratada con la porfirina en oscuridad o en iluminación.

- . El espectro de absorción de PBGasa tratada en oscuridad con URO I mostró ligeras variaciones mientras que, para la enzima expuesta a la porfirina bajo luz UV, las alteraciones fueron importantes y se verificaron en la zona de absorción de los aminoácidos fotosensibles.
 - . El espectro de absorción de deaminasa tratada en oscuridad con URO I presentó modificaciones en la zona de absorción de cistina, cisteína, metionina e histidina. Las variaciones en esta región del espectro fueron mucho mayores cuando la enzima fue expuesta a la porfirina y luz UV.
 - . El espectro de absorción de URO-D expuesta a URO I en oscuridad presentó ligeras variaciones en la zona de absorción de cistina; la absorbancia fue algo más reducida en esta región cuando la enzima fue tratada con la porfirina en presencia de luz UV.
- Se hizo la electroforesis de las enzimas parcialmente purificadas y tratadas con URO I.
- . La exposición del ALA-D a la porfirina dio origen a la alteración de la movilidad electroforética de la proteína y a la aparición de nuevas bandas proteicas luego de 90 y 120 minutos de tratamiento bajo luz UV.

La electroforesis de PBGasa tratada con URO I mostró modificaciones en la movilidad electroforética de la banda correspondiente a la isomerasa, pero no presentó variaciones en la banda correspondiente a la deaminasa.

La deaminasa parcialmente purificada y tratada con URO I no presentó variaciones en la movilidad electroforética. El comportamiento electroforético de la deaminasa fue similar al mostrado por la enzima formando parte del complejo enzimático PBGasa.

- . La electroforesis de URO-D mostró una reducción en la intensidad de la banda correspondiente a la enzima control, concomitante con el aumento de intensidad de una nueva banda proteica de mayor peso molecular, en función del tiempo de exposición a URO I.
- Los estudios químicos, espectrales y electroforéticos indican que el tratamiento de las enzimas con URO I produce alteraciones estructurales en la molécula que reducen su actividad enzimática y alteran su espectro de absorción y su movilidad electroforética. La exposición a la luz UV en presencia de la porfirina afecta aún más a la proteína debido a reacciones fotooxidativas que involucran a los aminoácidos fotosensibles. La pérdida de grupos -SH totales y de grupos amino libres sugiere que las alteraciones estructurales se deben a la formación de uniones intrapeptídicas.

***CONCLUSIONES
FINALES***

CONCLUSIONES FINALES

La fotosensibilización de biomoléculas es un fenómeno conocido desde principios de siglo (Raab, 1900) y se sabe que requiere la presencia de oxígeno y de un compuesto con propiedades fotosensibilizantes (Moan y col., 1979). Las porfirinas son eficientes sensibilizadores, por lo cual son muy importantes en fotobiología y fotomedicina.

En el presente trabajo se estudió el efecto fotodinámico de la URO I sobre algunas enzimas del camino biosintético del hemo y de otros caminos metabólicos, y se investigó su mecanismo de acción.

Se observó que la URO I produce inactivación de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D, y que esta inactivación es mayor aún cuando las enzimas son expuestas a la luz UV en presencia de la porfirina. En ambos casos, el efecto de URO I fue dependiente de la concentración, temperatura y tiempo de contacto con la porfirina. Los estudios en anaerobiosis revelaron que la acción fotodinámica de URO I requiere la presencia de oxígeno; en cambio, la ausencia de oxígeno no modificó los resultados obtenidos en oscuridad y aerobiosis. Iluminando las enzimas con luz blanca en presencia de URO I, se obtuvieron inactivaciones del mismo orden de las producidas por exposición a la luz UV en presencia de la porfirina.

La preincubación de ALA-D, PBGasa y deaminasa en presencia de sus sustratos protegió las actividades enzimáticas frente al efecto de URO I, tanto en oscuridad como en iluminación.

Estos resultados sugieren que el efecto fotodinámico de URO I estaría mediado por reacciones fotooxidativas, mientras que la inactivación en oscuridad podría deberse a la unión de la porfirina a la proteína, causando cambios conformacionales con

reducción de la actividad enzimática.

La URO I produjo inactivación fotodinámica y no fotodinámica de otras enzimas citoplasmáticas y mitocondriales como ALA-S, Succ.CoA-S, rodenasa, LDH y GLDH.

Utilizando otras porfirinas, se observó inactivación fotodinámica y no fotodinámica de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D. El grado de inactivación fue dependiente de la naturaleza de las cadenas laterales y de su distribución en el anillo porfirínico.

Otros conocidos fotosensibilizadores, como luminol, riboflavina, rosa de Bengala y azul de metileno, produjeron distintos grados de inactivación de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D.

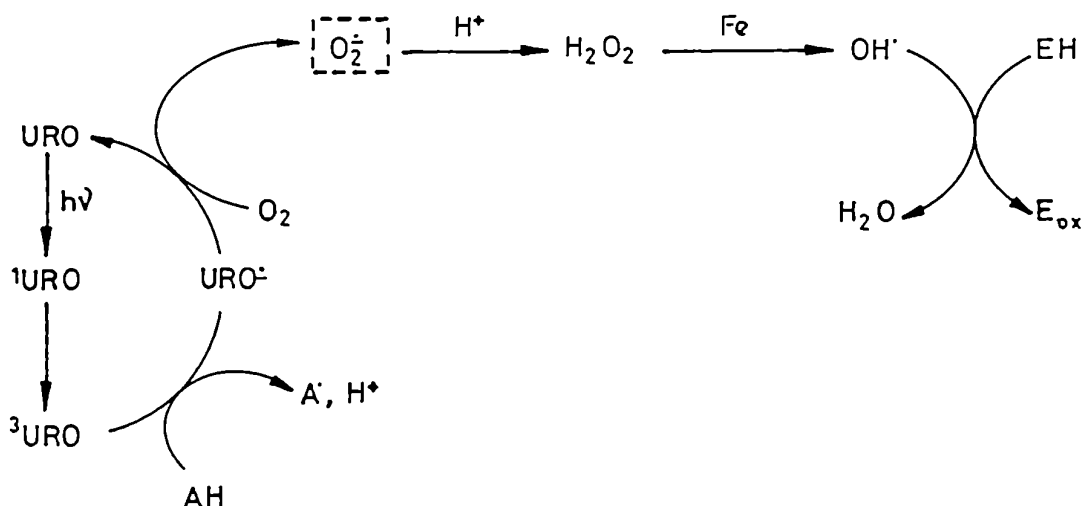
Empleando "scavengers" específicos para distintas especies reactivas, se estudió el mecanismo de inactivación enzimática inducida por URO I. Se pudo comprobar así que el efecto de la porfirina no estaría mediado por reacciones tipo II, o bien que no sería éste el mecanismo preponderante. Se verificó también que la inactivación enzimática inducida por URO I involucra la transferencia de electrones, primer paso en las reacciones fotodinámicas tipo I.

La presencia de SOD no impidió el efecto de URO I sobre ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D, mientras que los "scavengers" de peróxido de hidrógeno y de radicales hidroxilo protegieron las actividades enzimáticas del efecto de la porfirina. Estos resultados indicarían que no se forma $O_2^{\cdot-}$ en los sistemas investigados, sin embargo esto no se puede descartar ya que la degradación de este radical produce peróxido de hidrógeno. Por otro lado, se ha reportado la formación de un radical aniónico $URO^{\cdot-}$ en sistemas similares a los aquí empleados. Este radical se comportaría como el $O_2^{\cdot-}$, siendo capaz de reaccionar con oxígeno y permitiendo la generación de peróxido de hidrógeno.

Los datos obtenidos indican que el mecanismo de acción de URO I involucra a las especies reactivas peróxido de hidrógeno

y OH^\cdot . Estos resultados se confirmaron utilizando distintos quelantes de hierro que modifican la velocidad de la reacción de Fenton.

En base a los estudios realizados se propone un mecanismo químico para explicar la inactivación enzimática de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D mediada por URO I:



AH: dador de electrones; EH: enzima blanco; Eox: enzima oxidada

Al absorber un fotón, la URO pasa al estado excitado singulete (^1URO); el cruzamiento intersistema, con inversión de espín, da como resultado la porfirina en estado triplete (^3URO), de menor energía pero mayor vida media. La reacción tipo I es iniciada por la transferencia de un electrón desde un dador de electrones (AH) a la porfirina excitada, dando lugar a la formación del radical aniónico $\text{URO}^{\cdot-}$. Este radical aniónico, en presencia de oxígeno molecular, daría origen a la formación de peróxido de hidrógeno, retornando la porfirina a su estado energético basal. No se descarta

la posibilidad de que la interacción del radical $\text{URO}^{\cdot-}$ con el oxígeno dé como producto el radical superóxido el cual, a su vez, originaría peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno, en presencia de Fe(II) , produce radicales hidroxilo, los que serían responsables de la oxidación de aminoácidos esenciales para la actividad de las enzimas blanco (EH).

Para estudiar el efecto molecular de URO I sobre ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D, se purificaron las enzimas provenientes de GR humanos, y se trataron con la porfirina por distintos períodos de tiempo, en oscuridad o bajo luz UV.

Se observó que la pérdida de grupos $-\text{SH}$ totales aumenta progresivamente con el tiempo de contacto de la proteína con URO I, y a los 120 minutos de exposición es similar para las enzimas tratadas en oscuridad o bajo luz UV. En cambio, la pérdida de grupos $-\text{NH}_2$ libres fue mayor cuando las enzimas se expusieron a URO I y luz UV que cuando se las trató con la porfirina en oscuridad. Estos resultados sugieren que los grupos $-\text{SH}$ serían más afectados por la presencia de URO I, mientras que los grupos $-\text{NH}_2$ serían más afectados por las reacciones fotooxidativas.

Los estudios químicos, espectrales y electroforéticos indican que el tratamiento de ALA-D, PBGasa, deaminasa y URO-D con URO I produce alteraciones estructurales en la molécula que reducen su actividad enzimática y alteran su espectro de absorción y su movilidad electroforética. La exposición a la luz UV en presencia de la porfirina afecta aún más a la proteína debido a reacciones fotooxidativas que involucran a los aminoácidos fotosensibles.

Se observó que la pérdida de grupos $-\text{SH}$ y $-\text{NH}_2$ no se correlaciona con la pérdida de actividad enzimática. Esto se debería a que, en el caso de PBGasa y deaminasa, habría una mayor proporción de grupos $-\text{SH}$ y $-\text{NH}_2$ esenciales para la actividad enzimática involucrados en las reacciones fotooxidativas, mientras que, en el caso de ALA-D y URO-D, sería mayor la proporción de grupos no esenciales afectados por estas reacciones. Los estudios realizados

parecen indicar que las interacciones moleculares que ocurren se deberían a uniones de tipo intrapeptídico.

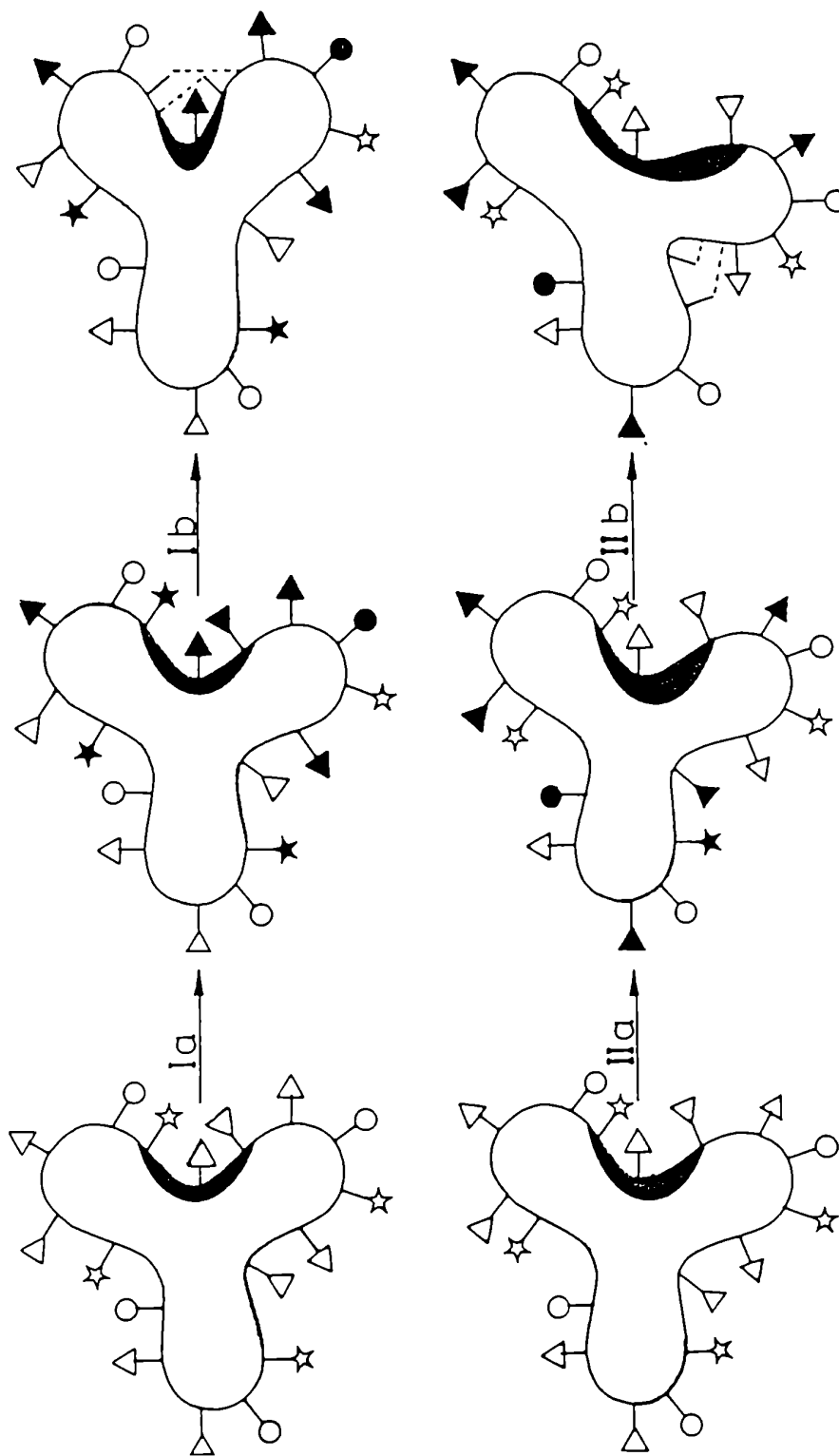
Si bien, los estudios electroforéticos no mostraron formación de agregados moleculares de alto peso molecular, se debe tener en cuenta que se utilizaron enzimas purificadas y tratadas *in vitro*. No se puede descartar que las enzimas en un pool multiproteico puedan formar uniones interpeptídicas con otras proteínas dando heteropolímeros.

En base a los resultados obtenidos en la presente investigación, se propone un mecanismo molecular para explicar la inactivación enzimática de PBGasa y deaminasa (I), y de ALA-D y de URO-D (II) inducida por URO.I:

Caso I: Este caso correspondería a PBGasa y deaminasa.

En el paso a se fotooxidaría mayor proporción de grupos -SH y amino esenciales que grupos no esenciales para la actividad enzimática. Dado que, aparentemente, el centro activo de estas enzimas es de naturaleza hidrofílica, probablemente la URO I tiene más fácil acceso a este sitio y produce la fotooxidación de aminoácidos fotosensibles allí ubicados, de modo que se dificulta la posterior unión del sustrato a la proteína.

- . En el paso b se producirían uniones intrapeptídicas que dificultarían aún más la entrada de los sustratos al sitio catalítico de la enzima.




(Δ) Grupos -SH esenciales, (∇) grupos -SH no esenciales, (\star) grupos -NH₂ esenciales, (\circ) grupos -NH₂ no esenciales, ($\blacktriangle, \blacktriangledown$) grupos -SH fotooxidados, (\bullet, \bullet) grupos -NH₂ fotooxidados

Caso II: Este caso correspondería a ALA-D y URO-D.

En el paso a se fotooxidaría mayor proporción de grupos -SH y amino no esenciales que grupos esenciales para la actividad enzimática. El centro activo de estas enzimas es de naturaleza hidrofóbica y, probablemente, la URO I no tiene fácil acceso a este sitio, con lo que los aminoácidos allí ubicados no estarían tan afectados como en el caso anterior.

- . En el paso b se producirían uniones intrapeptídicas que, si bien no bloquearían el sitio activo de las enzimas, modificarían la estructura necesaria para exhibir su actividad catalítica.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'S. P. M.', written over two horizontal lines.A large, stylized handwritten signature in black ink, possibly 'M. L.', consisting of several sweeping, interconnected strokes.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- Afonso, S.G.; Chinarro, S.; Stella, A.M.; Batlle, A.M. del C.; Lenczner, M.J. y Magnin, P.H. (1985) Rev. Arg. Dermatol. 66, 12.
- Afonso, S.G.; Buzaleh, A.M.; Navone, N.M.; Polo, C.F.; Schoua, E.; Vázquez, E.S. y Batlle, A.M. del C. (1987) Rev. Arg. Dermatol. 68, 303.
- Aft, R.L. y Mueller, G.C. (1985) Life Sci. 36, 2153.
- Albretch, H.O. (1928) Z. Phys. Chem. 136, 121.
- Anderson, P.M. y Desnick, R.J. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6924.
- Anderson, P.M. y Desnick, R.J. (1980) J. Biol. Chem. 255, 1993.
- Anderson, R.R. y Parrish, J.A. (1981) J. Invest. Dermatol. 77, 13.
- Anwar, M. y Prebble, J. (1977) Photochem. Photobiol. 26, 475.
- Aoki, Y.; Wada, O.; Urata, G.; Takaku, F. y Nakao, K. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 568.
- Aragonés, A.; García, R.C.; San Martín de Viale, L.C.; Tomio, J.M. y Grinstein, M. (1972) Anales Asoc. Quím. Arg. 60, 239.
- Babior, B.M.; Kepnes, R.S. y Curnette, J.T. (1973) J. Clin. Invest. 52, 741.
- Bachowski, G.J.; Morehouse, K.M. y Girotti, A.W. (1988) Photochem. Photobiol. 47, 635.
- Barclay, N. (1974) Arch. Dis. Child. 49, 404.
- Batlle, A. M. del C. y Grinstein, M. (1964 a) Biochim. Biophys. Acta 82, 1.
- Batlle, A.M. del C. y Grinstein, M. (1964 b) Biochim. Biophys. Acta 82, 13.
- Batlle, A.M. del C. y Rimington, C. (1965) Ciencia e Inv. 22, 369.
- Batlle, A.M. del C. y Rossetti, M.V. (1977) Int. J. Biochem. 8, 251.

- Batlle, A.M. del C. y Stella, A.M. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 861.
- Batlle, A.M. del C. Benson, A. y Rimington, C. (1965) *Biochem. J.* 97, 731.
- Batlle, A.M. del C.; Ferramola, A.M. y Grinstein, M. (1967) *Biochem. J.* 104, 244.
- Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M.; Ferramola, A.M.; Sopena, Y.; Wider de Xifra, E.A. y Sancovich, H.A. (1978 a) *Int. J. Biochem.* 9, 401.
- Batlle, A.M. del C.; Wider, E.A. y Stella, A.M. (1978 b) *Int. J. Biochem.* 9, 871.
- Batlle, A.M. del C.; Magnin, P.H. y Wider, E.A. (1981) *Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento.* EUDEBA.
- Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M.; Melito, V. y Parera, V.E. (1989) *Acta Bioq. Clin. Latinoamer.* XXIII, 315.
- Beale, S.I. (1978) *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 29, 95.
- Beale, S.I.; Gough, S.P. y Granick, S. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 2719.
- Beattie, A.D. y Goldbert, A. (1976) en "Porphyrins in Human Diseases" (Ed. M. Doss) Karger, Basel, p. 245.
- Becker, D.M.; Viljoen, J.D.; Katz, J. y Kramer, S. (1977) *Br. J. Haematol.* 366, 171.
- Bellin, J.S. y Yankus, C.A. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 123, 18.
- Bevan, D.R.; Bodlander, P. y Shemin, D. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2030.
- Bickers, D.R.; Keogh, L.; Rifkind, A.B.; Harber, L.C. y Kappas, A. (1977) *J. Invest. Dermatol.* 68, 5.
- Bickers, D.R.; Dixit, R. y Mukhtar, H. (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108, 1032.
- Bishop, D.F. y Desnick, R.J. (1982) *Enzyme* 28, 91.
- Blankaert, N.; Heirwegh, K.P.M. y Compernelle, F. (1976) *Biochem. J.* 155, 405.
- Blankaert, N.; Compernelle, F.; Leroy, P.; van Hourtte, R.; Fevery, J. y Heirwegh, K.P.M. (1978) *Biochem. J.* 171, 203.

- Bloomer, J.R. (1976) *Lancet* 2, 226.
- Blumenthal, K.M. y Heinrikson, R.L. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 278, 530.
- Blumenthal, S.G.; Taggart, D.B.; Ikeda, R.M.; Ruebner, B. y Bergstrom, D.E. (1977) *Biochem. J.* 167, 535.
- Bodaness, S.R. (1984) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118, 191.
- Bodaness, R.S. y Chan, P.C. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 8554.
- Bond, J.S.; Francis, S.H. y Park, J.H. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 1041.
- Bonkowsky, H.L.; Bloomer, J.R.; Ebert, P.S. y Mahoney, M.I. (1975) *J. Clin. Invest.* 56, 1139.
- Bottomley, S.S.; Tanaka, M. y Everett, M.A. (1975) *J. Lab. Clin. Med.* 86, 126.
- Bradford, M.M. (1976) *Analytical Biochem.* 72, 248.
- Brandt, A. y Doss, M. (1981) *Hum. Genet.* 58, 194.
- Brenner, D.A. y Bloomer, J.R. (1980) *Clin. Chem. Acta* 100, 259.
- Bridger, W.A. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 42, 948.
- Bridger, W.A.; Millen, W.A. y Boyer, R. (1968) *Biochemistry* 7, 3608.
- Brodie, M.J.; Moore, M.R. y Goldberg, A. (1977 a) *Lancet* 2, 699.
- Brodie, M.J.; Tompson, G.G. y Moore, M.R. (1977 b) *Q. J. Med.* 46, 229.
- Brun, A. y Sandberg, S. (1985) *Photochem. Photobiol.* 41, 535.
- Butler, J. y Halliwell, B. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.* 218, 174.
- Buzaleh, A.M. (1988) Tesis Doctoral, UBA.
- Cam, S. y Nigogosyan, G. (1963) *J. Am. Med. Assoc.* 183, 88.
- Canella, C. y Berni, R. (1983) *FEBS Lett.* 162, 180.
- Cavallini, D.; Scandurra, R. y De Marco, C. (1965) *Biochem. J.* 96, 781.
- Cohen, G. y Hochstein, P. (1963) *Biochemistry* 2, 1420.
- Collier, G.E. y Nishimura, J.S. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 4938.
- Compernelle, F.; van Hees, G.P.; Fevery, J. y Heirwegh, K.P.M. (1971) *Biochem. J.* 125, 811.
- Cookson, G.H. y Rimington, C.A. (1953) *Nature* 171, 875.

- Coombs, T.L.; Omote, T. y Vallee, B.L. (1964) *Biochemistry* 3, 653.
- Cornelius, C.E.; Kelly, K.C. y Himes, J.A. (1975) *Cornell.Vet.* 65, 90.
- Cornford, P. (1964) *Biochem. J.* 91, 64
- Costa, M. Pecci, L.; Pensa, B. y Canella, C. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 596.
- Cowtan, E.R.; Yoda, B. e' Israels, L.G. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 194.
- Cripps, D.J. y Mac Eachern, W.N. (1971) *Arch. Pathol.* 91, 497.
- Cruces Prado, M.J.; de Salamanca, R.E.; Vereá Hernando, M.; Peña Payero, M.L.; Catalán Beltrán, T. y Robledo Aguilar, A. (1980) *Dermatológica* 161, 205.
- Chinarro, S.; Stella, A.M.; Berges, L.; de Salamanca, R.E. y Batlle, A.M. del C. (1983) *N. Arch. Fac. Med.* 41, 70.
- Christensen, T.; Moan, J.; Brown Mc Ghie, J.; Waksvik, H. y Stigum, H. (1983) *Adv. Exp. Med. Biol.* 60, 151.
- Dailey, H.A. y Smith, A. (1984) *Biochem. J.* 223, 441.
- Dalton, J.; Mac Auliff, C. y Slater, D. (1972) *Nature* 235, 388.
- Das, M.; Dixit, R.; Mukhtar, H. y Bickers, D.R. (1985) *Cancer Res.* 45, 608.
- Davila, J. y Harriman, A. (1989) *Photochem. Photobiol.* 50, 29.
- Day, R.S.; Pimstone, N.R. y Eales, L. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 897.
- Day, R.S.; Blekkenhorst, G. y Eales, L. (1980) *N. Engl. J. Med.* 303, 1368.
- de Goeij, A.F.P.M.; Ververgaert, P.H.J.T. y van Steveninck, J. (1975) *Clin. Chim. Acta* 62, 287.
- de Goeij, A.F.P.M.; van Strallen, R.J.C. y van Steveninck, J. (1976) *Clin. Chim. Acta* 71, 485.
- Della Pietra, D. y Dose, K. (1965) *Biophysik* 2, 347.
- De Matteis, F. y Gibbs, A.H. (1975) *Biochem. J.* 146, 285.
- De Matteis, F.; Gibbs, A.H. y Smith, A. (1980 a) *Biochem. J.* 189, 645.

- De Matteis, F.; Gibbs, A.H. y Tephly, T.R. (1980 b) *Biochem. J.* 188, 145.
- De Verneuil, H.; Grandchamp, B. y Nordmann, Y. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 611, 176.
- Dixit, R.; Mukhtar, H. y Bickers, D.R. (1983) *Photochem. Photobiol.* 37, 173.
- Donaldson, E.M.; Donaldson, A.D. y Rimington, C. (1967) *Br. Med. J.* 1, 659.
- Doss, M.; Tiepermann, R.; Schneider, J. y Schmid, H. (1979) *Klin. Wochenschr.* 57, 1123.
- Doss, M.; Schneider, J.; Tiepermann, R. y Brandt, A. (1982) *Clin. Biochem.* 15, 52.
- Doss, M.; Tiepermann, R. y Schneider, J. (1983) *Klin. Wochenschr.* 61, 699.
- Dougherty, T.J.; Grindley, G.B.; Weishaupt, K.R. y Boyle, D.G. (1975) *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 115.
- Dougherty, T.J.; Kaufman, J.E. y Goldfarb, A.; Weishaupt, K.R.; Boyle, D. y Middleman, A. (1978) *Cancer Res.* 38, 2628.
- Dougherty, T.J.; Boyle, D.G.; Weishaupt, K.R.; Henderson, B.A.; Potter, W.R.; Bellnier, D.A. y Wityk, K.E. (1983) *Adv. Exp. Med. Biol.* 60, 3.
- Dubbelman, T.M.A.R.; de Goeij, A.F.P.M. y van Steveninck, J. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 511, 141.
- Dubbelman, T.M.A.R.; de Goeij, A.F.P.M. y van Steveninck, J. (1980 a) *Biochim. Biophys. Acta* 595, 133.
- Dubbelman, T.M.A.R.; Haasnot, C. y van Steveninck, J. (1980 b) *Biochim. Biophys. Acta* 601, 220.
- Dubertret, L.; Santus, R.; Bazin, M. y de Sa e Melo, T. (1982) *Photochem. Photobiol.* 35, 103.
- Eales, L.; Day, R.S. y Blekkenhorst, G.H. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 837.
- Ebbon, J.G. y Tait, G.H. (1969) *Biochem. J.* 111, 573.
- Elder, G.H. (1980) *Clin. Haematol.* 9, 3371.
- Elder, G.H.; Magnus, I.A.; Handa, F. y Doyle, M. (1974) *Enzyme* 17, 219.

- Elder, G.H.; Evans, J.O.; Thomas, N.; Cox, R.; Brodie, M.J.; Moore, M.R.; Goldberg, A. y Nicholson, D.C. (1976) *Lancet* 2, 1217.
- Elder, G.H.; Lee, G.B. y Tovey, J.A. (1978) *N. Engl. J. Med.* 299, 274.
- Elder, G.H.; Sheppard, D.M.; Salamanca, R.E. y Olmos, A. (1980) *Clin. Sci.* 58, 477.
- Elder, G.H.; Tovey, J.A. y Sheppard, D.M. (1983) *Biochem. J.* 215, 45.
- Epstein, B. y Kuwana, T. (1965) *Photochem. Photobiol.* 4, 1157.
- Epstein, J.H.; Tuffanelli, D.L. y Epstein, W.L. (1973) *Arch. Dermatol.* 107, 689.
- Falk, J.E. (1964) en "Porphyrins and Metalloporphyrins. Their General, Physical and Coordination Chemistry and Laboratory Methods", B.B.A. Library volume 2, Elsevier Publishing Company, Amsterdam - London - New York, cap. 9, p. 115.
- Felsher, B.; Carpio, N.; Engleking, D. y Nunn, A. (1982) *N. Engl. J. Med.* 306, 766.
- Finelli, V.N.; Klauder, D.S.; Karaffa, M.A. y Petering, H.G. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 303.
- Firey, P.A. y Rodgers, M.A.J. (1988) *Photochem. Photobiol.* 47, 615.
- Flitter, W.; Rowley, D.A. y Halliwell, B. (1983) *FEBS Lett.* 158, 310.
- Floyd, R.A. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* 225, 263.
- Foote, C.S. (1968) *Science* 162, 963.
- Foote, C.S. (1982) en "Pathology of Oxygen" (Ed. A.P. Autor), Academic Press, New York, p. 21.
- Freidrich, P.; Polgar, L. y Szabolsci, G. (1964) *Nature (London)* 202, 1214.
- Fridovich, I. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 4053.
- Fridovich, I. (1974) en "Advances in Enzymology" (Ed. Alton Meister), Interscience, vol. 41, p. 35.
- Fridovich, I. (1978) *Science* 201, 875.

- Fridovich, I. y Handler, P. (1962) J. Biol. Chem. 237, 961.
- Fritsch, P.; Gschnait, F.; Hönigsmann, H. y Wolff, K. (1976) Br. J. Dermatol. 94, 263.
- Frydman, R.B. y Frydman, B. (1973) Biochim. Biophys. Acta 293, 506.
- Frydman, R.B.; Tomaro, M.L.; Buldain, G.; Awruch, J.; Díaz, L. y Frydman, B. (1981) Biochemistry 20, 5177.
- Fukuda, H.; Paredes, S.R. y Batlle, A.M. del C. (1988) Comp. Biochem. Physiol. 91B, 285.
- Fukuda, H.; Sopená de Kracoff, Y.E.; Iñigo, L.E.; Paredes, S.R.; Ferramola de Sancovich, A.M.; Sancovich, H.A. y Batlle, A.M. del C. (1990) J. Enzyme Inhibition 3, 295.
- Fumagalli, S.A.; Kotler, M.L.; Rossetti, M.V. y Batlle, A.M. del C. (1985) Int. J. Biochem. 17, 485.
- Gaffron, H. (1926) Biochem. Z. 179, 157.
- Gajdos, A. y Gajdos-Török, M. (1969) Porphirins et Porphiries. Biochimie et clinique (Ed. Masson y Co.).
- García, R.C.; San Martín de Viale, L.C.; Tomio, J.M. y Grinstein, M. (1973) Biochim. Biophys. Acta 309, 203.
- Garesse, R.; Castell, J.V.; Vallejo, C.G. y Marco, R. (1979) Eur. J. Biochem. 99, 253.
- Gibson, S.L. y Hilf, R. (1985) Photochem. Photobiol. 42, 367.
- Gibson, K.D.; Laver, W.G. y Neuberger, A. (1958) Biochem. J. 70, 71.
- Girotti, A.W. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 1367.
- Girotti, A.W. (1979) Biochemistry 18, 4403.
- Girotti, A.W. (1990) Photochem. Photobiol. 51, 497.
- Girotti, A.W. y Deziel, M.R. (1983) Adv. Exp. Med. Biol. 60, 213.
- Glad, B.W. y Spikes, J.D. (1966) Radiat. Res. 27, 237.
- Goldberg, A. y Moore, M. (1980) Clin. Hematol. 9, 225.
- Goldberg, A.; Rimington, C.; Lochhead, A.C. (1967) Lancet 1, 632.
- Goldstein, B.D. y Harber, L.C. (1972) J. Clin. Invest. 51, 892.
- Gomer, C.J. y Razum, N.J. (1984) Photochem. Photobiol. 40, 435.

- Gordon, E.R.; Goresky, C.A.; Chan, T.H. y Perlin, A.S. (1976) *Biochem. J.* 155, 477.
- Grandchamp, B. y Nordmann, Y. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 1089.
- Grandchamp, B.; Phung, N. y Nordmann, Y. (1977) *Lancet* ii, 1348.
- Granick, S. (1954) *Science* 120, 1105.
- Granick, S. y Bogorad, L. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 3610.
- Granick, S. y Mauzerall, D. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 1119.
- Granick, S. y Sassa, S. (1971) en "Metabolic Regulation" (Ed. H.J. Vogel), Academic Press, New York, vol. 5, p. 77.
- Granick, J.L.; Sassa, S.; Granick, S.; Levere, R.D. y Kappas, A. (1973) *Biochem. Med.* 8, 149.
- Grossweiner, L.I.; Patel, A.S. y Grossweiner, J.B. (1982) *Photochem. Photobiol.* 36, 159.
- Gschnait, F.; Wolff, K. y Konrad, K. (1975 a) *Br. J. Dermatol.* 92, 545.
- Gschnait, F.; Konrad, K.; Hönigsmann, H.; Denk, H. y Wolff, K. (1975 b) *J. Invest. Dermatol.* 65, 290.
- Gutteridge, J.M.C. (1985) *FEBS Lett.* 185, 19.
- Habeeb, A.F.S.A. (1972) en "Methods in Enzymology" (Eds. S. Colowick y N. Kaplan), Academic Press, New York, vol. XXV, p.457.
- Haeger-Aronson, B.; Stathers, G. y Swahn, G. (1968) *Ann. Intern. Med.* 69, 221.
- Halliwell, B. (1978) *FEBS Lett.* 96, 238.
- Halliwell, B. (1981) en "Age Pigments" (Ed. R.S. Sohal), Elsevier, North-Holland, Amsterdam, p. 1.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1984) *Biochem. J.* 219, 1.
- Harris, D.T. (1926) *Biochem. J.* 20, 288.
- Haseloff, R.F. y Ebert, B. (1989) *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 3, 593.
- Hawk, J.L.M.; Magnus, I.A. y Elder, G.H. (1978) *J. R. Soc. Med.* 71, 775.
- Hayashi, N.; Yoda, B. y Kikuchi, G. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 83.

- Hayashi, N.; Watanabe, N. y Kikuchi, G. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115, 700.
- Heilmeyer, H. y Clotten, R. (1964) *Med. Alemana* 5, 262 (Traducción del artículo publicado en *Dtsch. Med. Wschr.* 89 (1964) 649).
- Heirwegh, K.P.M.; Blankaert, N.; Compernelle, F.; Fevery, J. y Zaman, Z. (1977) *Biochem. Soc. Trans.* 5, 316.
- Hilf, R.; Smail, D.B.; Murant, R.S.; Leakey, P.B. y Gibson, S.L. (1984) *Cancer Res.* 44, 1483.
- Hirsch, R.E. (1989) *Seminars in Hematology* 26, 47.
- Hoare, D.S. y Heath, H. (1959) *Biochem. J.* 73, 679.
- Horowitz, P. y Westley, J. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 986.
- Hsu, J.; Goldstein, B.D. y Harber, L.C. (1971) *Photochem. Photobiol.* 13, 67.
- Hunter, J.A.A.; Khan, S.A.; Hope, E.; Beattie, A.D.; Beveridge, G.W.; Smith, A.W.M. y Goldberg, A. (1971) *Br. J. Dermatol.* 84, 301.
- Hutton, J.J. y Gross, S.R. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.* 141, 284.
- Ignarro, L.J.; Wood, K.S. y Wolin, M.S. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 2870.
- Imlay, J.A.; Chin, S.M. y Linn, S. (1988) *Science* 240, 640.
- Jackson, A.H. y Games, D.E. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244, 591.
- Jackson, A.H. y Kenner, W. (1968) en "Porphyrins and Related Compounds" (Ed. T.W. Goodwin), Lond. N.Y. Academic, p.5.
- Jackson, A.H.; Games, D.E.; Couch, P.; Jackson, J.R.; Belcher, R.B. y Smith, S.G. (1974) *Enzyme* 17, 81.
- Jackson, A.H.; Ferramola, A.M.; Sancovich, H.A.; Evans, N.; Matlin, S.A.; Ryder, D.J. y Smith, S.G. (1976 a) *Ann. Clin. Res.* 8, 64.
- Jackson, A.H.; Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Evans, N.; Games, D.E.; Matlin, S.A.; Elder, G.H. y Smith, S.G. (1976 b) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 273, 191.
- Jackson, A.H.; Nagaraja Rao, K.R.; Supphayen, D.M. y Smith, S.G. (1977) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 696.

- Jackson, A.H.; Elder, G.H. y Smith, S.G. (1978) *Int. J. Biochem.* 9, 877.
- Jacob, F. y Monod, J. (1961) *Symp. Quant. Biol.* 26, 193.
- Jacobs, N.J. y Jacobs, J.M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 435.
- Jacobs, N.J. y Jacobs, J.M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 449, 1.
- Jaffé, E.R. (1964) en "Metabolic Processes Involved in the Formation and Reduction of Methemoglobin in Human Erythrocytes" (Ed. C. Bishop y D.M. Surgenor), Academic Press, New York, cap. 11, p. 397.
- Ji, T.H. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 7841.
- Jones, M.S. y Jones, O.T.G. (1969) *Biochem. J.* 113, 507.
- Jori, G.; Galiazzo, G. y Scoffone, E. (1969) *Biochemistry* 8, 2868.
- Jori, G.; Galiazzo, G.; Tamburro, A.M. y Scoffone, E. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 3375.
- Jori, G.; Reddi, E.; Cozzani, I. y Tomio, L. (1986) *Br. J. Cancer* 53, 615.
- Joubert, S.M.; Taljaard, J.J.F. y Shanley, B.C. (1973) *Enzyme* 16, 305.
- Kappas, A.; Sassa, S. y Anderson, K.E. (1983) en "Metabolic Basis of Inherited Diseases", 5ta. ed. (Eds. J. Stanbury, J. Wyngaarden, D. Fredrickson, J. Goldstein y M. Brown.), cap. 60, p. 1301.
- Kardish, R.M. y Woods, J.S. (1980) *J. Appl. Biochem.* 2, 159.
- Kaufman, S. y Alivisatos, S.G. (1955) *J. Biol. Chem.* 216.
- Kearns, D.R.; Hollins, R.A.; Khan, A.U. y Radlick, P. (1967) *J. Am. Chem. Soc.* 89, 5456.
- Kikuchi, G. (1973) *Mol. Cell Biochem.* 1, 169.
- Kikuchi, G.; Kumar, A.; Talmage, P. y Shemin, D. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 1214.
- Kint, A. y Geertz, M.L. (1973) *Arch. Dermatol. Res.* 246, 355.
- Kobayashi, Y. y Makino, K. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 208, 137.

- Kohn, K. y Kessel, D. (1979) *Biochem. Pharmacol.* 28, 2465.
- Konrad, K.; Hönigsmann, H.; Gschnait, F. y Wolff, K. (1975) *J. Invest. Dermatol.* 65, 300.
- Koopmann, G.E. y Batlle, A.M. del C. (1987) *Int. J. Biochem.* 19, 373.
- Koopmann, G.E.; Juknat de Geralnik, A.A. y Batlle, A.M. del C. (1986) *Int. J. Biochem.* 18, 935.
- Kornberg, A. (1955) en "Methods in Enzymology" (Eds. S. Colowick y N. Kaplan), Academic Press, New York, vol. I, p.441.
- Koshakji, R.P.; Harbison, R.D. y Bush, M.T. (1984) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 69.
- Koss, G.; Seubert, S.; Seubert, A.; Seidel, J.; Koransky, W. e Ippen, H. (1983) *Archs. Toxicol.* 52, 13.
- Kotler, M.L. (1988) Tesis Doctoral, UBA.
- Kuenzle, C.C. (1970) *Biochem. J.* 119, 411.
- Kushner, J.P.; Steinmuller, D.P. y Lee, G.R. (1975) *J. Clin. Invest.* 56, 661.
- Kushner, J.P.; Barbuto, A.J. y Lee, G.R. (1976) *J. Clin. Invest.* 58, 1089.
- Labbe, P.; Volland, C. y Chaix, P. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 159, 527.
- Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227, 680.
- Lamola, A.A.; Yamane, T. y Trozzolo, A.M. (1973) *Science* 179, 1131.
- Lamola, A.A.; Piomelli, S.; Poh-Fitzpatrick, M.B.; Yamane, T. y Harber, L.C. (1975) *J. Clin. Invest.* 56, 1528.
- Lamola, A.A.; Asher, I.; Müller-Eberhard, U. y Poh-Fitzpatrick, M.B. (1981) *Biochem. J.* 196, 693.
- Lascelles, J. (1964) en "Tetrapyrrole biosynthesis and its regulation", W.A. Benjamin, Inc., New York, Amsterdam.
- Laskowski, M. y Scheraga, H.A. (1954) *J. Am. Chem. Soc.* 76, 6305.
- Lee, P.C.C. y Rodgers, M.A.J. (1987) *Photochem. Photobiol.* 45, 79.
- Lim, H.W. y Gigli, I. (1981) *J. Invest. Dermatol.* 76, 4.

- Lim, H.W.; Gigli, I. y Wasserman, S.I. (1987) J. Invest. Dermatol. 88, 281.
- Lockwood, W.H. y Rimington, C. (1957) Biochem. J. 67, 8.
- Lombardo, M.E.; Araujo, L.S.; Juknat, A.A. y Batlle, A.M. del C. (1988) Comp. Biochem. Physiol. 91B, 279.
- Lombardo, M.E.; Araujo, L.S.; Juknat, A.A. y Batlle, A.M. del C. (1989) Eur. J. Biochem. 182, 657.
- Longas, M.O. y Poh-Fitzpatrick, M.B. (1982) Clin. Chim. Acta 118, 219.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
- Llambías, E.B.C. y Batlle, A.M. del C. (1970 a) Biochim. Biophys. Acta 220, 552.
- Llambías, E.B.C. y Batlle, A.M. del C. (1970 b) FEBS Lett. 9, 180.
- Llambías, E.B.C. y Batlle, A.M. del C. (1971 a) Biochem. J. 121, 327.
- Llambías, E.B.C. y Batlle, A.M. del C. (1971 b) Biochim. Biophys. Acta 227, 180.
- Llambías, E.B.C.; Locascio, G y Batlle, A.M. del C. (1971) Anal. Asoc. Quim. Arg. 59, 271.
- Magnin, P.H.; Batlle, A.M. del C.; Lenczner, J.M.; Parera, V.E.; Stella, A.M. y Godoy, O. (1986) Rev. Arg. Dermatol. 67, 163.
- Magnus, I.A.; Porter, A.D. y Rimington, C. (1959) Lancet 1, 912.
- Magnussen, C.R.; Levine, J.B.; Doherty, J.M.; Cheesman, J.O. y Tschudy, D.P. (1974) Blood 44, 857.
- Maines, M.D. (1981) Biochim. Biophys. Acta 173, 339.
- Maines, M.D. y Kappas, A. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 4293.
- Maines, M.D. y Kappas, A. (1976) Ann. Clin. Res. 8, 39.
- Maines, M.D.; Chung, A.S. y Kutty, R.K. (1982) J. Biol. Chem. 257, 14116.
- Malina, L.; Miller, V. y Magnus, I.A. (1978) Clin. Chim. Acta 83, 55.

- Margolis, F.L. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 145, 373.
- Marks, G.; Mc Cluskey, S.; Mackie, J.; Riddick, D. y James, C. (1988) FASEB J. 2, 2774.
- Martínez Carrión, M. (1967) J. Biol. Chem. 242, 1426.
- Massey, V.; Strickland, S.; Mayhew, S.G.; Howell, L.; Engel, P. C.; Matthews, R.; Schuman, M. y Sullivan, P.A. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 891.
- Mauck, M.R. y Girotti, A. (1973) Biochemistry 12, 3187.
- Mauzerall, D. y Granick, S. (1956) J. Biol. Chem. 219, 435.
- Mauzerall, D. y Granick, S. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1141.
- Mc Kay, R.; Druyan, R.; Getz, G.S. y Rabinowitz, M. (1969) Biochem. J. 114, 455.
- Mc Kinney, C.E. y Ades, I.Z. (1991) Int. J. Biochem. 23, 803.
- Meyer, U.A. y Schmid, R. (1983) en "The Metabolic Basis of Inherited Diseases" (Eds. J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson), New York, Mc Graw Hill, p. 1166.
- Miller, A.D.; Hart, G.J.; Packman, L.C. y Battersby, A.R. (1988) Biochem. J. 254, 915.
- Mintel, R. y Westley, J. (1966) J. Biol. Chem. 241, 3386.
- Mitra, J. y Metzler, D.E. (1988) Biochim. Biophys. Acta 965, 93.
- Miyagi, K.; Kaneshima, M.; Kawakami, J.; Nakada, F.; Petryka, Z.J. y Watson, C.J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 6172.
- Moan, J.; Mc Ghie, J.B. y Christensen, T. (1982) Photobiochem. Photobiophys. 4, 337.
- Moan, J.; Pettersen, E.O. y Christensen, T. (1979) Br. J. Cancer 39, 398.
- Moan, J.; Rognan, S.E.; Evensen, J.F. y Malik, Z. (1987) Photobiochem. Photobiophys. Suppl., 385.
- Moore, M. y Labbe, R. (1964) Clin. Chem. 10, 1105.
- Moore, M.R. y Disler, P.B. (1985) en "Clinics in Dermatology" (Eds. P.B. Disler y M.R. Moore), J.B. Lippincott, Philadelphia, vol. 3, p. 7.
- Moore, M.R.; Thompson, G.G.; Goldberg, A.; Ippen, H.; Seubert, A. y Seubert, S. (1978) Int. J. Biochem. 9, 933.

- Moore, M.R.; Meredith, P.A. y Goldberg, A. (1980 a) en "Lead Toxicity" (Eds. R.D. Singhal y J.A. Thomas), Baltimore, Urban & Schwartzberg, p. 79.
- Moore, Mc Coll, K.E.L. y Goldberg, A. (1980 b) Int. J. Biochem. 12, 941.
- Morton, K.A.; Kushner, J.P.; Straka, J.G. y Burnham, B.F. (1983) J. Clin. Invest. 71, 1744.
- Moskowitz, A.; Weimer, M.; Lightner, D.A.; Petryka, Z.J.; Davis, H. y Watson, C.J. (1970) Biochem. Med. 4, 149.
- Müller, W.; Lissner, R. e Ippen, H. (1974) Eur. Porphyrias Assoc. Bull. (Ed. H. Ippen) 2, 18.
- Mustajoki, P. (1976) Ann. Clin. Res. 8, 133.
- Muthukrishnan, S.; Padmanaban, G. y Sarma, P.S. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4241.
- Nandi, D.L. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 188, 266.
- Nandi, D. y Shemin, D. (1968) J. Biol. Chem. 243, 1224.
- Navone, N.M.; Afonso, S.G.; Polo, C.F. y Batlle, A.M. del C. (1992) Comp. Biochem. Physiol, en prensa.
- Neuberger, A. (1980) Int. J. Biochem. 12, 787.
- Neuberger, A. y Scott, J.J. (1953) Nature 172, 1093.
- Nilsson, R.; Swanbeck, G. y Wennersten, G. (1975) Photochem. Photobiol. 22, 183.
- Nishimura, J.S. (1986) en "Advances in Enzymology" (Ed. A. Meister), John Wiley & Sons, New York, vol. 58, p. 141.
- Noguchi, T. y Mori, R. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10335.
- Novoa, W.B. y Schwert, G.W. (1961) J. Biol. Chem. 236, 2150.
- O'Carra, P. (1975) en "Phorphyrins and Metalloporphyrins" (Ed. K.M. Smith), Amsterdam, Elsevier, p. 123.
- Ockner, R.K. y Schmid, R. (1961) Nature 189, 499.
- Ohashi, A. y Kikuchi, G. (1979) J. Biochem. (Tokyo) 83, 239.
- Ohashi, A. y Sinohara, H. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 370.
- Orten, J.M. y Neuhaus, O.W. (1984) en "Bioquímica Humana" (Ed. Médica Panamericana), p. 507.
- Parrish, J.A. (1983) Adv. Exp Med. Biol. 60, 91.

- Parrish, J.A.; Rosen, C.F. y Gange, R.W. (1985) .Ann. N. Y. Acad. Sci. 453, 354.
- Paterniti, J.R. y Beattie, D.S. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6112.
- Paterniti, J.R.; Simone, J.J. y Beattie, D.S. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 189, 86.
- Patton, G.M. y Beattie, D.S. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4467.
- Paveto, C.; Passeron, S.; Stella, A.M. y Batlle, A. (1989) Comp. Biochem. Physiol. 94B, 635.
- Paxton, J.W.; Moore, M.R.; Beattie, A.D. y Goldberg, A. (1975) Clin. Sci. Mol. Med. 49, 441.
- Perrot, H.; Germain, D. y Euvrard, S. (1977) Arch. Dermatol. Res. 259, 177.
- Peters, H.A.; Gocmen, A.; Cripps, D.J.; Bryan, G.T. y Dogramaci, I. (1982) Archs. Neurol. 39, 744.
- Peterson, D.A.; Gerrard, J.M. y Rao, G.H.R. (1980) Prostaglandins Med. 4, 73.
- Pimstone, N.R. (1985) en "Clinics in Dermatology" (Eds. P.B. Disler y M.R. Moore), J.B. Lippincott, Philadelphia, vol. 3, 83.
- Piomelli, S.; Lamola, A.A.; Poh-Fitzpatrick, M.B.; Seaman, C. y Harber, L.C. (1975) J. Clin. Invest. 56, 1519.
- Piper, W.N.; Condie, L.W. y Tephly, T.R. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 159, 671.
- Poh-Fitzpatrick, M.B. (1985) en "Clinics in Dermatology" (Eds. P.B. Disler y M.R. Moore), J.B. Lippincott, Philadelphia, vol. 3, p. 41.
- Polo, C.F.; Stella, A.M.; Wider, E.A.; Batlle, A.M. del C.; Lenczner, J.M.; Altuna, L. y Magnin, P.H. (1983) La Prensa Médica Argentina 70, 433.
- Polo, C.F.; Afonso, S.G. y Batlle, A.M. del C. (1988) Acta Bioq. Clin. Latinoamer. XXII, 439.
- Porra, R.J. y Jones, O.T.G. (1963 a) Biochem. J. 87, 181.
- Porra, R.J. y Jones, O.T.G. (1963 b) Biochem. J. 87, 186.
- Poulson, R. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3730.

- Poulson, R. y Polglase, W.J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6367.
- Poulson, R. y Polglase, W.J. (1975) J. Biol. Chem. 250, 1269.
- Prasad, A.R.S.; Nishimura, J.S. y Horowitz, P.M. (1983) Biochemistry 22, 4272.
- Raab, O. (1900) Z. Biol. 39, 524.
- Rajagolapan, K.V.; Fridovich, I. y Handler, P. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2022.
- Ray, W.J. (1967) en "Methods in Enzymology" (Eds. S. Colowick y N. Kaplan), Academic Press, New York, vol. XI, p. 490.
- Rebeiz, C.A. y Castelfranco, P.A. (1973) Ann. Rev. Plant Physiol. 24, 129.
- Reid, A. (1931) Biochem. Z. 242, 159.
- Rimington, C. (1939) Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 127, 106.
- Rimington, C. (1958) Rev. Pure Appl. Chem. 8, 129.
- Rimington, C. (1960) Biochem. J. 75, 260.
- Rimington, C. y Krol, C. (1955) Nature 175, 629.
- Rimington, C. y Sveinsson, S.L. (1950) Scand. J. Clin. Lab. Invest. 2, 209.
- Rimington, C.; Lockwood, W.H. y Belcher, R.V. (1968) Clin. Sci. 35, 211.
- Ríos de Molina, M. del C.; Taira, M.C. y San Martín de Viale, L.C. (1977) Natl. Meet. Argent. Soc. Biochem. Invest. 13th Abstr. 49.
- Ríos de Molina, M. del C.; Wainstok de Calmanovici, R.; Grinstein, M. y San Martín de Viale, L.C. (1980) Clin. Chim. Acta 108, 447.
- Ríos de Molina, M. del C.; Billi, S.; Wainstok de Calmanovici, R. y San Martín de Viale, L.C. (1984) Acta Physiol. Pharmacol. Latinoamer. 34, 55.
- Romeo, G. y Levin, E.Y. (1970 a) Biochem. Genet. 4, 417.
- Romeo, G. y Levin, E.Y. (1970 b) Biochem. Genet. 4, 659.
- Romeo, G. y Levin, E.Y. (1971) Biochim. Biophys. Acta 230, 330.
- Rossetti, M.V. y Batlle, A.M. del C. (1977) Int. J. Biochem. 8, 277.

- Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A.; Kotler, M.L. Fumagalli, S.A. y Batlle, A.M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 761.
- Rossi, E.; van de Vorst, A. y Jori, G. (1981) Photochem. Photobiol. 34, 447.
- Roswell, D.F. y White, E.H. (1978) en "Methods in Enzymology" (Eds. S. Colowick y N. Kaplan), Academic Press, New York, vol. LVII, p. 409.
- Rotilio, G.; Calabrese, L.; Finazzi-Agró, A. y Mondovi, B. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198, 618.
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. y Grinstein, M. (1969) Biochim. Biophys. Acta 191, 130.
- Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Batlle, A.M. del C.; Kivilevich, A. y Grinstein, M. (1976) Acta Physiol. Latinoam. 26, 379.
- Sandberg, S. y Brun, A. (1982) J. Clin. Invest. 70, 693.
- Sandberg, S. y Romslo, I. (1980) Biochim. Biophys. Acta 593, 187.
- Sandberg, S. y Romslo, I. (1981) Clin. Chim. Acta 109, 193.
- Sandberg, S.; Glette, J.; Hopen, G.; Solberg, C. y Romslo, I. (1981) Photochem. Photobiol. 34, 471.
- Sandberg, S.; Romslo, I.; Hording, G. y Bjorndal, T. (1982) Acta Dermatovener. (Stockholm) 100, 75.
- San Martín de Viale, L.C. y Grinstein, M. (1968) Biochim. Biophys. Acta 158, 79.
- San Martín de Viale, L.C.; Viale, A.A.; Nacht, S. y Grinstein, M. (1970) Clin. Chim. Acta 28, 13.
- San Martín de Viale, L.C.; Ríos de Molina, M. del C.; Wainstok de Calmanovici, R. y Tomio, J.M. (1976 a) Int. Porphyrin Meet. 1st., 445.
- San Martín de Viale, L.C.; Tomio, J.M.; Ferramola, A.M.; Sancovich, H.A. y Tigier, H. (1976 b) Int. Porphyrin Meet. 1st., 453.
- San Martín de Viale, L.C.; Ríos de Molina, M. del C.; Wainstok de Calmanovici, R. y Tomio J.M. (1977) Biochem. J. 168, 393.

- Sano, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5276.
- Sano, S. y Granick, S. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1173.
- Sargent, J.R. (1969) en "Methods in zone electrophoresis", BDH Chemicals Ltd. Pole, England, 2da. ed., p. 85.
- Sassa, S. y Granick, S. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 517.
- Sassa, S.; Solish, G.; Levere, R.D. y Kappas, A. (1975) J. Exp. Med. 142, 722.
- Sawada, H.; Takeshita, M.; Sugita, Y. y Yoneyama, Y. (1969) Biochim. Biophys. Acta 178, 145.
- Sconfienza, C.; van de Vorst, A. y Jori, G. (1980) Photochem. Photobiol. 31, 351.
- Scotto, A.W.; Chang Li-Fen, L. y Beattie, D.S. (1983) J. Biol. Chem. 258, 81.
- Scharschmidt, B.F.; Waggoner, J.G. y Berk, P.D. (1975) J. Clin. Invest. 56, 1280.
- Schmid, R. (1960) N. Engl. J. Med. 263, 397.
- Schmid, R.; Schwartz, S. y Watson, C.J. (1954) Arch. Int. Med. 93, 167.
- Schoenfeld, N.; Greenblat, Y.; Epstein, O.; Lahav, M.; Beigel, Y. y Atsmon, A. (1982) FEBS Lett. 138, 277.
- Scholnick, P.L.; Hammaker, L.E. y Marver, H.S. (1972 a) J. Biol. Chem. 247, 4126.
- Scholnick, P.L.; Hammaker, L.E. y Marver, H.S. (1972 b) J. Biol. Chem. 247, 4132.
- Schothorst, A.A. y van Steveninck, J. (1972) Clin. Chim. Acta 39, 161.
- Schothorst, A.A.; van Steveninck, J.; Went, L.M. y Suurmond, D. (1970) Clin. Chim. Acta 28, 41.
- Schothorst, A.; Suurmond, D. y Ploem, J. (1977) J. Invest. Dermatol. 69, 551.
- Seret, A.; Gandin, E. y van de Vorst, A. (1986) Photochem. Photobiol. 12, 259.
- Shemin, D. (1976) Phil. Trans. R. Soc. Lond. 273, 109.

- Shemin, D. y Russel, C.S. (1953) J. Am. Chem. Soc. 75, 4873.
- Shioi, Y.; Doi, M. y Sasa, T. (1984) Plant Cell Physiol. 25, 1487.
- Singh, N.K.; Tyagi, R.K. y Datta, K. (1991) Eur. J. Biochem. 198, 581.
- Smith, A.G. y Francis, J.E. (1979) Biochem. J. 183, 455.
- Smith, E.L.; Landon, M.; Piszkiwicz, D.; Brattin, W.J.; Langley, T.J. y Melamed, M.D. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. 67, 724.
- Smith, S.F.; Ferramola, A.M.; Sancovich, H.A.; Evans, N.; Matlin, S.A.; Ryder, D.J. y Jackson, A.H. (1976) Ann. Clin. Res. 8, 89.
- Smith, A.G.; Francis, J.E.; Kay, S.J.E. y Greig, J.B. (1981) Biochem. Pharmacol. 30, 2825.
- Smith, A.G.; Francis, J.E. y Greig, J.B. (1985) Biochem. Pharmacol. 34, 1817.
- Song, P.S. y Metzler, D.E. (1967) Photochem. Photobiol. 6, 691.
- Sörbo, B.H. (1955) en "Methods in Enzymology" (Eds. S.P. Colowick y N.O. Kaplan), Academic Press, New York, vol. II, p. 334.
- Spikes, J.D. (1975) Ann. N.Y. Acad. Sci. 244, 496.
- Spikes, J.D. (1983) Adv. Exp. Med. Biol. 60, 180.
- Spikes, J.D. y Mac Knight, M.L. (1970) Ann. N.Y. Acad. Sci. 171, 149.
- Srivastava, G.; Borthwick, I.A.; Brooker, J.D.; Wallace, J.C.; May, B.K. y Elliot, W.H. (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun. 117, 344.
- Stafforini, D.M.; Polo, C.F.; Stella, A.M.; Wider de Xifra, E. A. y Batlle, A.M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 757.
- Stella, A.M. y Batlle, A.M. del C. (1977) Int. J. Biochem. 8, 353.
- Strand, L.J.; Felscher, B.F.; Redecker, A.G. y Marver, H.S. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1315.
- Strand, L.J.; Meyer, U.; Felscher, B.F.; Redecker, A.G. y Marver, H.S. (1972) J. Clin. Invest. 51, 2530.

- Strecker, H.J. (1955) en "Methods in Enzymology" (Eds. S.P. Colowick y N.O. Kaplan), Academic Press, New York, vol. II, p. 220.
- Suwa, K.; Kimura, T. y Schaap, A.P. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 785.
- Suwa, K.; Kimura, T. y Schaap, A.P. (1978) Photochem. Photobiol. 28, 469.
- Taira, M.C. y San Martín de Viale, L.C. (1984) Enzyme 31, 79.
- Tait, G.H. (1968) en "Porphyrins and Related Compounds. Bio-Chemical Society Simposia N° 28" (Ed. T.W. Goodwin), Academic Press, London-New York, p. 19.
- Taylor, M.B. y Radda, G.K. (1972) en "Methods in Enzymology" (Eds. S. Colowick y N. Kaplan), Academic Press, New York, vol. XVIII (parte B), p. 496.
- Tenhunen, R.; Marver, H.S. y Schmid, R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 6388.
- Tenhunen, R.; Marver, H.S. y Schmid, R. (1970 a) J. Lab. Clin. Med. 75, 410.
- Tenhunen, R.; Ross, M.E.; Marver, H.S. y Schmid, R. (1970 b) Biochemistry 9, 298.
- Tigier, H.A.; Batlle, A.M. del C. y Locascio, G.A. (1970) Enzymology 38, 43.
- Tomio, J.M.; García, R.C.; San Martín de Viale, L.C. y Grinstein, M. (1970) Biochim. Biophys. Acta 198, 353.
- Tomita, M.; Irie, M. y Ukita, T. (1969) Biochemistry 8, 5149.
- Topi, G.C.; D'Alessandro Galdolfo, L.; Fazio, M. y Mariani, L. (1977) Ann. Derm. Vénéreol. 104, 68.
- Tsai, S.F.; Bishop, D.F. y Desnick, R.J. (1987) J. Biol. Chem. 262, 1268.
- Tsai, S.F.; Bishop, D.F. y Desnick, R.J. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 7049.
- Tsukamoto, I.; Yoshinaga, T. y Sano, S. (1979) Biochim. Biophys. Acta 570, 167.
- Tyrrell, R.M. y Keyse, S.M. (1990) J. Photochem. Photobiol. B: Biology 4, 349.

- Tyrell, D.L. y Marks, G. (1972) *Biochem. Pharmacol.* 21, 2077.
- Udenfriend, S.; Stein, S.; Böhlen, P. y Dairman, W. (1972) *Science* 178, 871.
- van Gog, H. y Schothorst, A.A. (1973) *J. Invest. Dermatol.* 61, 42.
- van Steveninck, J. y Dubbelman, T.M.A.R. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* 791, 98.
- van Steveninck, J.; Dubbelman, T.M.A.R. y Verweij, H. (1983) en "Porphyrin Photosensitization" (Eds. D. Kessel y T.V. Dougherty), Plenum Press, New York, p. 227.
- van Steveninck, J.; Boegheim, J.P.J. y Dubbelman, T.M.A.R. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 821, 1.
- van Steveninck, J.; Tijssen, K.; Boegheim, J.P.J.; van der Zee, J. y Dubbelman, T.M.A.R. (1986) *Photochem. Photobiol.* 44, 711.
- van Steveninck, J.; Boegheim, J.P.J.; Dubbelman, T.M.A.R. y van der Zee, J. (1987) *Biochem. J.* 242, 611.
- Varigos, G.; Schiltz, J.R. y Bickers, D.R. (1982) *J. Clin. Invest.* 69, 129.
- Varticovsky, L.; Kushner, J.P. y Burnham, B.F. (1980) *J. Biol. Chem.* 355, 3742.
- Vázquez, E.S. (1984) Tesis Doctoral, UBA.
- Vázquez, E.S.; Wider de Xifra, E.A. y Batlle, A.M. del C. (1980) *Int. J. Biochem.* 12, 721.
- Vázquez, E.S.; Afonso, S.G.; Buzaleh, A.M.; Navone, N.M.; Polo, C.F.; Schoua, E. y Batlle, A. (1987 a) *Toxicology* 46, 73.
- Vázquez, E.S.; Buzaleh, A.M.; Wider, E. y Batlle, A.M. del C. (1987 b) *Int. J. Biochem.* 19, 217.
- Verweij, H. y van Steveninck, J. (1982) *Photochem. Photobiol.* 35, 265.
- Verweij, H.; Dubbelman, T.M.A.R. y van Steveninck, J. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* 647, 89.
- Viale, A.A. (1978) Tesis Doctoral, UBA.
- Viale, A.A.; Lorenti, A.S.; Wider de Xifra, E.A. y Batlle, A.M. del C. (1980) *Rev. Arg. Microbiol.* 12, N° 1.

- Vincent, S.H.; Holeman, B.; Cully, B.C. y Müller-Eberhard, U. (1986 a) *Life Sciences* 38, 365.
- Vincent, S.H.; Smith, A.G. y Müller-Eberhard, U. (1986 b) *Hepatology* 6, 3915 (Abstract), 37th Ann. Meet. Am. Assoc. St. Liver Diseases, Chicago, Illinois.
- Vogel, H.J. y Bridger, W.A. (1983) *Biochem. Soc. Trans.* 11, 315.
- Wainstok de Calmanovici, R.; Billy, S.; Aldonatti, C. y San Martín de Viale, L.C. (1986) *Biochem. Pharmacol.* 35, 2399.
- Wainstok de Calmanovici, R.; Billi, S.; Aldonatti, C. y San Martín de Viale, L.C. (1987) *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 37, 541.
- Walling, C. (1982) en "Oxidase and Related Redox Systems" (Eds. T.E. King, H.S. Mason y M. Morrison), Pergamon Press, Oxford, p. 85.
- Wallis, C. y Melnick, J.L. (1965) *Photochem. Photobiol.* 4, 159.
- Wan, S.; Parrish, J.A.; Anderson, R.R. y Madden, M. (1981 a) *Photochem. Photobiol.* 34, 679.
- Wan, S.; Anderson, R.R. y Parrish, J.A. (1981 b) *Photochem. Photobiol.* 34, 493.
- Warburg, O. y Christian, W. (1941) *Biochem.Z.* 310, 384.
- Watson, C.L.; Runge, W.; Raddeini, L.; Rossenmaier, J. y Cardinal, R.C. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 52, 478.
- Weil, L. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.* 110, 57.
- Weil, L.; Gordon, W.G. y Buchert, A.R. (1951) *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 90.
- Weishaupt, K.R.; Gomer, C.J. y Dougherty, T.J. (1976) *Cancer Res.* 36, 2326.
- Weng, L.; Heinrikson, L. y Westley, J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 8109.
- Westhead, E.W. (1965) *Biochemistry* 4, 2139.
- Westhead, E.W. (1972) en "Methods in Enzymology" (Eds. S. Colowick y N. Kaplan), Academic Press, New York, vol. XXV, p. 401.

- Whiting, M.J. (1976) *Biochem. J.* 158, 391.
- Whiting, M.J. y Elliot, W.H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6818.
- Whiting, M.J. y Granick, S. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 1340.
- Wider de Xifra, E.A. (1972) Tesis Doctoral, UBA.
- Wider de Xifra, E.A. y Tigier, H.A. (1971) *Enzymologia* 41, 217.
- Wider de Xifra, E.A.; Battlle, A.M. del C. y Tigier, H.A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 235, 511.
- Wider de Xifra, E.A.; Sandy, J.D.; Davies, R. y Neuberger, A. (1976) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)* 273, 79.
- Wilson, E.L.; Burger, P.E. y Dowdle, E.B. (1972) *Eur. J. Biochem.* 29, 563.
- Williams, D.C.; Morgan, E.S. y Battersby, A.R. (1981) *Biochem. J.* 193, 301.
- Winer, A.D. y Schwert, G.W. (1958) *J. Biol. Chem.* 231, 1065.
- With, T.K. (1973) *Biochem. J.* 137, 597.
- With, T.K. (1980) *Clin. Haematol.* 9, 345.
- Wolfson, S.J.; Bartczak, A. y Bloomer, J.R. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 3543.
- Wolkoff, A.W.; Chowdhury, J.R. y Arias, I.M. (1983) en "The Metabolic Basis of Inherited Diseases" (Eds. J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson, J.L. Goldstein y M.S. Brown), Mc Graw-Hill Book Co., p. 1386.
- Yoneyama, Y.; Sawada, H.; Takeshita, M. y Sugita, Y. (1969) *Lipids* 4, 321.
- Yoshinaga, T. y Sano, S. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 4722.
- Yoshinaga, T.; Sassa, S. y Kappas, A. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 7778.
- Yubisui, T. y Yoneyama, Y. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.* 150, 77.
- Yubisui, T.; Takeshita, M. y Yoneyama, Y. (1976) *Experientia* 32, 859.
- Zalar, G.L.; Poh-Fitzpatrick, M.B.; Krohn, D.L.; Jacobs, R. y Harber, L.C. (1977) *Arch. Dermatol.* 113, 1392.
- Zaman, Z.; Abboud, M.M. y Akhtar, M. (1972) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1263.

