

Tesis de Posgrado

Biosíntesis de porfirinas en corteza cerebral y cerebelo de rata : Estudios sobre la porfobilinogeno - deaminasa. Empleo del ácido delta- aminolevúlico como generador de especies reactivas de oxígeno

Princ, Fernando Gabriel

1995

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:

Princ, Fernando Gabriel. (1995). Biosíntesis de porfirinas en corteza cerebral y cerebelo de rata : Estudios sobre la porfobilinogeno - deaminasa. Empleo del ácido delta-aminolevúlico como generador de especies reactivas de oxígeno. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2740_Princ.pdf

Cita tipo Chicago:

Princ, Fernando Gabriel. "Biosíntesis de porfirinas en corteza cerebral y cerebelo de rata : Estudios sobre la porfobilinogeno - deaminasa. Empleo del ácido delta-aminolevúlico como generador de especies reactivas de oxígeno". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2740_Princ.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



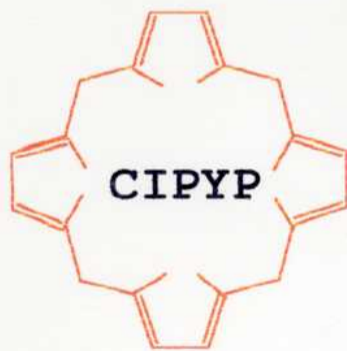
UBA

Universidad de Buenos Aires

BIOSINTESIS DE PORFIRINAS EN CORTEZA
CEREBRAL Y CEREBELO DE RATA.
ESTUDIOS SOBRE LA PORFOBILINOGENO -
DEAMINASA.

EMPLEO DEL ACIDO δ -AMINOLEVULICO
COMO GENERADOR DE ESPECIES REACTIVAS
DE OXIGENO

Fernando Gabriel Princ



TESIS 1995

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

27403

52

BIOSINTESIS DE PORFIRINAS EN CORTEZA CEREBRAL Y
CEREBELO DE RATA. ESTUDIOS SOBRE LA PORFOBILINOGENO
-DEAMINASA. EMPLEO DEL ACIDO δ -AMINOLEVULICO COMO
GENERADOR DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

Fernando Gabriel Princ

DIRECTOR: Dra. Alcira María del Carmen Batlle

CODIRECTOR: Dra. Adela Ana Juknat

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

Tesis presentada para optar al título de
DOCTOR de la Universidad de Buenos Aires

1995

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
ABREVIATURAS.....	ii
OBJETIVOS.....	iii
INTRODUCCION	
CAPITULO I: CAMINO METABOLICO DEL HEMO.....	1
I.1. Porfirinas.....	1
I.2. Biosíntesis del hemo.....	6
I.3. Catabolismo.....	10
I.4. Enzimas polimerizantes.....	10
I.5. Regulación de la síntesis del hemo.....	19
I.6. Desórdenes en la biosíntesis del hemo.....	24
I.7. Bibliografía.....	36
CAPITULO II: RADICALES LIBRES.....	43
II.1. Introducción.....	43
II.2. Química y reactividad en los sistemas biológicos.....	47
II.3. Especies reactivas de oxígeno y sus "scavengers".....	58
II.4. Especies reactivas de oxígeno y el camino biosintético de las porfirinas.....	63
II.5. Especies reactivas de oxígeno y sistema nervioso central.....	65
II.6. Bibliografía.....	68

MATERIALES Y METODOS

CAPITULO I: MATERIALES.....	71
I.1. Animales.....	71
I.2. Reactivos.....	72
I.3. Secuestradores.....	72
I.4. Geles.....	72
I.5. Equipos.....	72
CAPITULO II: METODOS.....	76
II.1. Preparación de los tejidos.....	76
II.2. Metodología de incubación.....	76
II.3. Determinaciones.....	79
II.4. Tratamiento de datos.....	88
II.5. Bibliografía.....	90

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I: PORFOBILINOGENO-DEAMINASA DE CORTEZA

CEREBRAL y CEREBELO DE RATA. AISLAMIENTO y PROPIEDADES.	92
I.1. Introducción.....	92
I.2. Aislamiento de la PBG-D.....	93
I.3. Purificación parcial de la PBG-D.....	102
I.4. Propiedades.....	107
I.5. Efecto del ácido fólico y de la sulfamerazina.....	114
I.5. Bibliografía.....	120

CAPITULO II: ESTUDIOS SOBRE PARTICULADOS DE CEREBELO.....

II.1. Captación de ALA y su metabolización a PBG y porfirinas.	
Elección del sistema de estudio.....	123
II.2. Viabilidad celular.....	124
II.3. Respuesta del particulado de cerebelo al agregado exógeno de ALA.....	136
II.4. Estudios sobre el transporte de ALA.....	140
II.5. Bibliografía.....	143

CAPITULO III: EFECTO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO

SOBRE LA PORFIRINOGENESIS.....	145
III.1. Introducción.....	145
III.2. Marcadores de daño celular.....	148
III.3. Efecto del anión superóxido.....	154
III.4. Efecto del peróxido de hidrógeno.....	159
III.5. Efecto del radical hidroxilo.....	164
III.6. Bibliografía.....	170

CAPITULO IV: "EFECTO GLUCOSA"

IV.1. Efecto del ALA sobre la captación glucosa.....	173
IV.2. Efecto de los "scavengers"	178
IV.3. Importancia biológica del "efecto glucosa"	185
IV.4. Bibliografía.....	189

CONCLUSIONES

I. Porfobilinógeno-Deaminasa de corteza cerebral y cerebelo de rata. Aislamiento y propiedades.....	191
II. Estudios sobre particulados de cerebelo.....	193
III. Efecto de especies reactivas de oxígeno sobre la porfirinogénesis.....	196
IV. "Efecto glucosa"	201
V. Bibliografía.....	204

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:

- a mi sol ,Laura, y a mi solcito, Pachi, porque considero que dedicarles esta Tesis no basta y es por esto que además quiero agradecerles por todo el tiempo que debieron esperar la presencia completa del esposo y del padre;

- a Ana Adela por ser y estar; por los dónde, cómo y cuándo, y porque desde aquella frase: Querés trabajar conmigo en porfirinas?, en la no tan lejana Química Biológica I del '87 empezamos una tarea casi ininterrumpida donde además de la investigación en conjunto pude disfrutar de una persona que vale y mucho;

- a Alcira, por haber confiado en mi para desarrollar este trabajo de investigación en el Centro que ella dirige, por ser mi Directora de Tesis compartiendo en todo momento su sapiencia y brindarme todo su apoyo para la realización de esta tarea;

- a Susana, Carina, Guillermo y Mariana gracias por el tiempo compartido, por el apoyo incondicional y por soportar a este tesista;

- a Mónica, por estar cerca mío, tanto hoy desde Asturias como ayer en el lab. 0101, alentándome con todo su fuerza para la concreción de este trabajo;

- a aquellos integrantes del CIPYP que me brindaron su apoyo por los gratos momentos que pasamos juntos;

- al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al Centro para el Desarrollo de la Industria Químico - Farmacéuticas (CEDIQUIFA) por la beca y los subsidios otorgados.

ABREVIATURAS

ALA	Acido δ -aminolevúlico
ALA-D	Acido δ -aminolevúlico-Dehidrasa
CAT	Catalasa
COPRO	Coproporfirina
COPROgen	Coproporfirinógeno
Da	Daltons
DMSO	Dimetilsulfóxido
GLU	Glucosa
HMB	Hidroximetilbilano
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Presión
PBG	Porfobilinógeno
PBGasa	Porfobilinogenasa
PBG-D	Porfobilinógeno-Deaminasa
PM	Peso molecular
PROTO	Protoporfirina
TCA	Acido tricloroacético
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SMZ	Sulfamerazina
SOD	Superóxido Dismutasa
TBA	Acido tiobarbitúrico
TBARS	Especies que reaccionan con el TBA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
URO	Uroporfirina
URO-D	Uroporfirinógeno-decarboxilasa
UROgen	Uroporfirinógeno

En las figuras, reacciones o tablas

I-	Pertenece a la Introducción
M-	Pertenece a Materiales y Métodos
R-	Pertenece a Resultados y Discusión

OBJETIVOS

Las porfirinas y sus derivados se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Son compuestos tetrapirrólicos que cumplen funciones fisiológicas fundamentales en todas las células vivas, formando parte como grupos prostéticos de una gran variedad de hemoproteínas, entre las que se hallan la hemoglobina, los citocromos, las peroxidasas, y la catalasa.

La biosíntesis del hemo está estrictamente regulada. Si los mecanismos de control fallan o son defectuosos, la síntesis o acumulación de intermediarios en la cadena de dicho camino metabólico puede alcanzar niveles mayores que los normales. Esto trae como consecuencia la aparición de una serie de patologías conocidas como **porfirias**, entre las cuales se destacan por su importancia las porfirias hepáticas. Dentro de estas últimas se encuentra la **porfiria aguda intermitente** (PAI), caracterizada bioquímicamente por una sobreproducción hepática de ácido δ -aminolevúlico (ALA) y porfobilinógeno (PBG), metabolitos que son excretados por orina. La afección enzimática de esta porfiria se encuentra a nivel de la enzima Porfobilinógeno - Deaminasa (PBG-D). Actualmente se conoce una gran cantidad de drogas que pueden desencadenar una crisis de porfiria aguda, siendo las más comunes los hipnóticos, barbitúricos, sulfonamidas, esteroides, anestésicos y alcohol.

A pesar de que el hígado es el órgano donde los intermediarios ALA y PBG se sintetizan en exceso, los síntomas clínicos predominantes pertenecen casi exclusivamente al sistema nervioso. Además, se ha estudiado extensamente la biosíntesis de porfirinas en hígado de distintas especies animales pero es muy poca la información existente acerca del metabolismo de las porfirinas en el tejido nervioso.

Dado estos antecedentes se decidió estudiar la enzima PBG-D de corteza cerebral y de cerebelo de rata. En la etapa inicial

del presente trabajo se planeó determinar las condiciones óptimas para la extracción y medición de la actividad de PBG-D. Una vez obtenida la enzima de ambas fuentes se desarrolló un método para la purificación de la misma y empleando la fracción parcialmente purificada, se efectuaron estudios comparativos de caracterización y cinética.

Por otra parte, aún se desconoce cuál es el mecanismo que ocurre en la neuropatía porfírica durante los ataques agudos de PAI. Las distintas hipótesis involucran al ALA como agentes neurotóxicos, aunque todavía está en discusión si éste atraviesa o no la barrera hematoencefálica, una vez ocurrida la sobreproducción hepática. Por otro lado el camino del hemo podría estar también alterado en el tejido nervioso, contribuyendo a desencadenar los síntomas característicos de esta patología.

Durante los últimos años se ha manejado la hipótesis que el ALA se autooxida generando especies reactivas de oxígeno (ROS) capaces de peroxidar los lípidos de las membranas y producir daño a nivel celular, actuando estas especies como agentes etiológicos de la PAI.

Considerando lo expuesto, fue objetivo de la presente Tesis investigar la captación de ALA y su metabolización a PBG y porfirinas empleando como modelo el sistema de particulado de cerebelo de rata. Para lograr este propósito en primer lugar había que determinar la viabilidad de los particulados, medida como incorporación de leucina a proteínas y como captación de glucosa. Sobre esta base, nuestro interés fue analizar la respuesta del particulado al agregado exógeno de ALA, variando la cantidad de proteína, la concentración de sustrato ALA y el tiempo de incubación.

Paralelamente a estos estudios se determinó la distribución de los metabolitos sintetizados y se identificaron las porfirinas formadas por HPLC. Además fue importante establecer la

dependencia energética del proceso de incorporación de ALA a las células del particulado.

En incubados a distintos tiempos y variando la concentración de sustrato ALA, se evaluó la formación de ROS, midiendo marcadores de daño celular (TBARS y dienos conjugados) y se estudió el efecto de "scavengers" de ROS como la SOD, la CAT y el DMSO sobre la captación de ALA y la biosíntesis de PBG y porfirinas.

Por otra parte y teniendo en cuenta que a los pacientes con PAI se les administra como tratamiento ácido fólico y una dieta en carbohidratos se resolvió llevar a cabo un estudio en particulados de cerebelo acerca de la captación de glucosa en presencia de ALA y el efecto de los distintos "scavengers". Comparativamente se analizó el efecto del ácido fólico sobre la biosíntesis de porfirinas en particulado y sobre la actividad de PBG-D de corteza cerebral y de cerebelo de rata.

Considerando la acción de las sulfonamidas como desencadenantes de una PAI y dado que la sulfamerazina (SMZ) produce una inhibición no competitiva reversible de la PBG-D de hígado de rata, correlacionada con la inhibición encontrada *in vivo* e *in vitro* en la PBG-D de sangre de rata, se estudió el efecto de la SMZ sobre la biosíntesis de porfirinas en el sistema de particulados, así como también sobre la actividad de PBG-D de corteza cerebral y de cerebelo de rata.

El conocimiento de la respuesta que brinden las células nerviosas al agregado de ALA exógeno es de sumo interés pues podrá contribuir posiblemente al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

INTRODUCCION

CAMINO METABOLICO DEL HEMO

	Página
I.1. Porphirinas.....	1
I.1.1. Importancia biológica.....	1
I.1.2. Estructura y nomenclatura.....	1
I.1.3. Propiedades.....	3
I.1.4. Funciones biológicas.....	4
I.2. Biosíntesis del hemo.....	6
I.3. Catabolismo.....	10
I.4. Enzimas polimerizantes.....	10
I.4.1. Porfobilinogenasa.....	10
I.4.2. Porfobilinógeno-Deaminasa.....	12
I.4.3. Mecanismo de reacción.....	15
I.5. Regulación de la síntesis del hemo.....	19
I.5.1. Mecanismos de control.....	20
I.6. Desórdenes en la biosíntesis del hemo.....	24
I.6.1. Generalidades y clasificación.....	24
I.6.2. Porfiria Aguda Intermitente.....	25
I.7. Bibliografía.....	36

I. CAMINO METABOLICO DEL HEMO

I.1. Porfirinas

I.1.1. Importancia biológica

Las porfirinas son de vital importancia y están ampliamente distribuidas en la naturaleza, fundamentalmente por su función de grupos prostéticos en una gran variedad de hemoproteínas, tales como: hemoglobina, mioglobina, catalasa, peroxidasas y los citocromos. Además en los organismos fotosintetizadores el espectro se amplía hacia las clorofilas y bacterioclorofilas, mientras que en bacterias el camino se deriva hacia la síntesis de las corrinas y la vitamina B₁₂.

I.1.2. Estructura y Nomenclatura

Los tetrapirroles proveen la estructura nuclear básica a las porfirinas (Figura I-1.1.), que consiste en un macrociclo de cuatro anillos pirrólicos denominados A, B, C y D, unidos por puentes metileno designados con α , β , γ y δ .

La existencia de dobles enlaces conjugados en la molécula la transforma en plana, resonante y altamente resistente a las modificaciones químicas.

Esta rígida estructura planar contiene ocho cadenas laterales unidas en las posiciones β -carbono de cada anillo pirrólico, que según la nomenclatura de Fischer, son numeradas del 1 al 8 desde el anillo A. El tipo de cadena lateral determina las características físicas de la porfirina resultante.

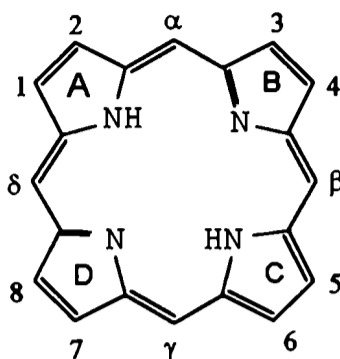


FIGURA I-I.1.: Núcleo de la porfirina

El metabolito biológicamente activo o fisiológico no lo constituye esta porfirina, sino el porfirinógeno (Figura I-I.2.), en el cual los puentes metileno se encuentran reducidos. A diferencia de las porfirinas que son coloreadas y fluorescentes, los porfirinógenos no son conjugados, son incoloros y no fluorescen, pero se oxidan espontáneamente a las correspondientes porfirinas.

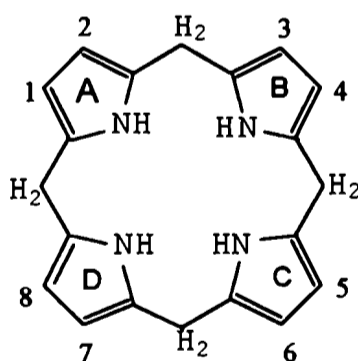


FIGURA I-I.2.: Estructura de los porfirinógenos

Se emplean nombres triviales, ya establecidos, para las porfirinas, así como también para la designación de los isómeros de posición (Tabla I-I.1.)

TABLA I-I.1.: Estructura y nombres de las porfirinas

NOMBRE	SUSTITUYENTE							
	Numeración de Fischer	1	2	3	4	5	6	7
Etioporfirina I	M	E	M	E	M	E	M	E
Etioporfirina II	M	E	E	M	M	E	E	M
Etioporfirina III	M	E	M	E	M	E	E	M
Etioporfirina IV	M	E	E	M	E	M	M	E
Uroporfirina I	A	P	A	P	A	P	A	P
Uroporfirina III	A	P	A	P	A	P	P	A
Porfirina heptacarboxilada III	M	P	A	P	A	P	P	A
Porfirina hexacarboxilada III	M	P	M	P	A	P	P	A
Porfirina pentacarboxilada III	M	P	M	P	M	P	P	A
Dehidroisocoproporfirina III	M	V	M	P	M	P	P	M
Coproporfirina I	M	P	M	P	M	P	M	P
Coproporfirina III	M	P	M	P	M	P	P	M
Protoporfirina IX	M	V	M	V	M	P	P	M
Mesoporfirina IX	M	E	M	E	M	P	P	M
Hematoporfirina IX	M	HE	M	HE	M	P	P	M
Deuteroporfirina IX	M	H	M	H	M	P	P	M

M: $-\text{CH}_3$; E: $-\text{C}_2\text{H}_5$; A: $-\text{CH}_2\text{COOH}$; P: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$;
V: $\text{CH}=\text{CH}_2$; HE: $-\text{CHOHCH}_3$

I.1.3. Propiedades

Las porfirinas poseen espectros de absorción típicos que son de fundamental importancia para su identificación y determinación cuantitativa.

El espectro consiste en una banda principal e intensa en la región de 400 nm llamada banda de Soret, y 4 bandas de menor absorción a longitudes de onda mayores (500 - 630 nm).

Las porfirinas emiten una intensa fluorescencia roja cuando se excitan con luz ultravioleta (aproximadamente 400 nm). En solución ácida exhiben 2 fuertes bandas de emisión correspondientes a las de absorción de mayor longitud de onda. El método espectrofluorométrico es muy sensible, pues permite detectar porfirinas en cantidades del orden de 0,01 a 10 nM. Cuando están queladas con metales que no tienen electrones desapareados (por ejemplo magnesio, zinc, estaño) también emiten fluorescencia al iluminarlas con luz UV, mientras que las queladas con metales paramagnéticos no fluorescen.

El núcleo pirrólico de estructura aromática es hidrofóbico, propiedad que se modifica por la presencia de sustituyentes laterales alifáticos portadores de grupos hidrofílicos. Así, la uroporfirina con 8 residuos carboxílicos es, de todas las porfirinas, la más soluble en agua. También son solubles en solventes orgánicos tales como dioxano y éter.

Los puntos isoeléctricos de las porfirinas están situados entre pH 3,0 y 4,5.

I.1.4. Funciones biológicas

Debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas, los tetrapirroles cíclicos o porfirinas juegan un rol central en la vida, tanto en procesos aeróbicos como anaeróbicos. Por ejemplo la energía solar es absorbida por las plantas y convertida en energía química a través de la síntesis de carbohidratos, participando en este proceso fotosintético una magnesio-porfirina: la clorofila. Mientras que el hemo, una hierro-porfirina, cumple un rol fundamental en la respiración de las células eucariotas.

Las porfirinas libres se encuentran en la naturaleza sólo en pequeñas cantidades y hasta el presente se desconoce su función fisiológica. Sin embargo se combinan fácilmente con metales dando lugar a quelatos que luego forman parte de la estructura de compuestos de gran importancia biológica.

El hemo, Fe^{2+} -Protoporfirina IX, por ejemplo, es el grupo prostético de varias hemoproteínas. Entre ellas se incluyen:

- Mioglobina y hemoglobina: responsables de la reserva y transporte de oxígeno.
- Citocromos mitocondriales: fundamentales en la transferencia reversible de electrones. Se clasifican en grupos a, b, c y d. En el citocromo a el grupo prostético es una hierro-porfirina en la que un radical formilo reemplaza a un metilo y una cadena hidrocarbonada sustituye a un grupo vinilo. El citocromo b contiene protohemo que no está unido covalentemente a la proteína. En el citocromo c existe una unión tioéter entre una cadena lateral vinilo y un grupo sulfhidrilo cisteínico de la proteína. El grupo prostético del citocromo d es una hierro-hidroporfirina (clorina).
- Citocromo P_{450} microsomal: es una hemoproteína unida a monóxido de carbono que cataliza oxidaciones de función mixta; forma parte de algunas monooxigenasas que hidrolizan, mediante el oxígeno molecular, una gran variedad de compuestos tales como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, ácidos grasos, esteroides y porfirinas.
- Catalasas: descomponen el peróxido de hidrógeno.
- Peroxidasas: activan el peróxido de hidrógeno.
- Triptofano pirrolasa: es una dioxigenasa que contiene protohematina IX como grupo prostético. Cataliza la ruptura oxidativa del anillo pirrólico del triptofano a formilkinurenina.

- Prostaglandina endoperóxido sintetasa e indolamina dioxigenasa.

En la mayoría de las hemoproteínas, el hemo está asociado con su apoproteína a través de la coordinación entre el átomo de hierro y un átomo de nitrógeno de las cadenas laterales básicas de las proteínas.

Asimismo las porfirinas se combinan con otros metales distintos de hierro dando lugar a la formación de compuestos fundamentales para la vida como la clorofila y la bacterioclorofila, que poseen magnesio en su estructura, o las corrinas que son derivados de las porfirinas complejadas con cobalto.

I.2. Biosíntesis del hemo

Los primeros estudios sobre estos pigmentos provienen de la escuela de Hans Fischer (1929), quien logró sintetizar químicamente hemina. Posteriormente varios grupos de investigadores (Shemin & Rittenberg, 1945, 1946, 1951; Dresel & Falk, 1953; Granick & Bogorad, 1953; Neuberger & Scott, 1953; Shemin & Russel, 1953; Cookson & Rimington, 1954; Rimington, 1955, 1958) empleando trazadores isotópicos contribuyeron a la elucidación de este camino biosintético y demostraron que los átomos de carbono y nitrógeno presentes en las porfirinas provenían de los precursores glicina y ácido succínico.

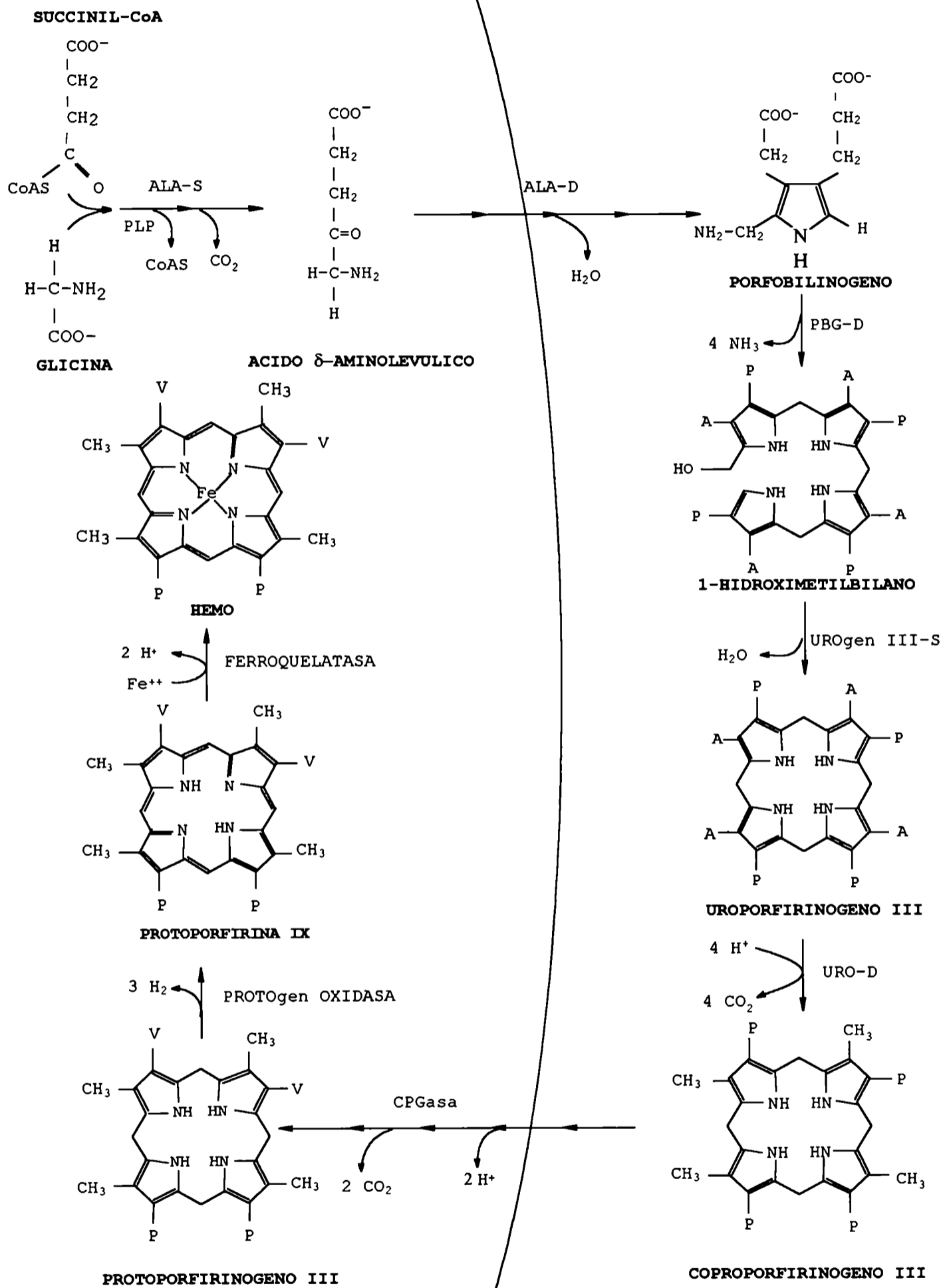
La mayoría de las células vivientes son capaces de sintetizar sus tetrapirroles, a partir de moléculas pequeñas, siguiendo el denominado camino biosintético de las porfirinas, que involucra la actividad de 8 enzimas (Figura I-I.3.).

La primera y las tres últimas están localizadas en la mitocondria, mientras que las restantes son citosólicas.

FIGURA I-1.3.- Camino biosintético del hemo. ALA-S= δ -Aminolevúlico Sintetasa; ALA-D= δ -Aminolevúlico-Dehidrasa; PBG-D= Porfobilinógeno-Deaminasa; UROgen III-S= Uroporfirinógeno III-Sintetasa; URO-D= Uroporfirinógeno-decarboxilasa; CPGasa= Coproporfirinogenasa.

MITOCONDRIA

CITOPLASMA



La síntesis del hemo comienza a partir de glicina y succinil-CoA, derivados del ciclo de los ácidos tricarbónicos, que por acción de la δ -Aminolevúlico Sintetasa (ALA-S) producen una molécula de ácido δ -aminolevúlico (ALA). La actividad de esta enzima requiere fosfato de piridoxal (PPL), como cofactor. Esta reacción constituye el paso limitante de la biosíntesis de los tetrapirroles y responde a un control por "feedback" negativo ejercido por el producto final hemo.

Se ha propuesto en plantas una ruta alternativa para la síntesis de ALA, a través de la conversión de glutamato en δ -dioxoalderato (DOVA) por acción de la enzima Glutamato-DOVA Transaminasa, el DOVA formado sufre una transaminación a ALA.

La biosíntesis prosigue con la condensación de dos moléculas de ALA en una reacción del tipo Knorr para generar el monopirrol no saturado porfobilinógeno (PBG) por acción de la enzima ALA-Dehidrasa (ALA-D). Esta es una proteína octamérica y requiere cuatro átomos de zinc para expresar su actividad. Para que esta reacción se produzca el ALA debe atravesar las membranas mitocondriales mediante un transporte activo, lo que constituiría otro paso regulatorio en este camino metabólico.

Posteriormente la actividad combinada de dos enzimas, que forman el complejo enzimático Porfobilinogenasa (PBGasa), la PBG-Deaminasa (PBG-D) y la Uroporfirinógeno III Sintetasa o Isomerasa (UROgen III-S) convierten al PBG en el primer tetrapirrol cíclico: el uroporfirinógeno III (UROgen III).

El paso siguiente es la decarboxilación secuencial de los cuatro grupos acéticos del UROgen III, por acción de la UROgen-Decarboxilasa (URO-D). Se generan así los distintos intermediarios con 7, 6 y 5 residuos carboxílicos culminando la decarboxilación en el coproporfirinógeno III (COPROgen III). La URO-D puede también emplear como sustrato al UROgen I y producir

la serie de tipo isomérico I. Estos son metabolitos no fisiológicos y de generarse se excretan.

Luego el COPROgen III se decarboxila oxidativamente a protoporfirinógeno IX (PROTOgen IX) por acción de la enzima Coproporfirinogenasa (CPGasa).

Posteriormente, la Protoporfirinógeno oxidasa (PPG-ox) elimina seis átomos de hidrógeno del PROTOgen IX para formar la protoporfirina IX (PROTO IX). El último paso de la secuencia es la inserción de hierro en el anillo porfirínico por acción de la Ferroquelatasa para generar el producto final hemo.

I.3. Catabolismo

Las hemoproteínas requieren de la actividad de enzimas proteolíticas que separan la proteína del hemo antes que éste pueda ser catabolizado. La ruptura del hemo se inicia por la actividad de la enzima microsomal hemooxigenasa, que emplea NADPH y oxígeno para oxidar el macrociclo, atacando los puentes metileno que unen los pirroles y produciendo biliverdina IX (BVR IX), hierro y CO. La BVR IX se reduce a bilirrubina por acción de la biliverdin reductasa, que también requiere NADPH como cofactor. La bilirrubina se excreta por la bilis luego de su conjugación con el ácido glucurónico.

I.4. Enzimas polimerizantes

I.4.1. Porfobilinogenasa

La PBGasa es un complejo proteico que cataliza la condensación de 4 moléculas de PBG para formar el primer tetrapirrol cíclico, el UROgen-III, intermediario fisiológico en la biosíntesis del hemo, clorofilas y corrinas.

La PBGasa está formada por dos enzimas: la PBG-D (EC 4.3.1.8) y la UROgen III-S (EC 4.2.1.75), ambas pueden diferenciarse por su susceptibilidad al calentamiento, siendo la PBG-D termoestable mientras que la Isomerasa no lo es.

La PBG-D cataliza la primer etapa que consiste en la condensación, cabeza - cola, de 4 moléculas de PBG originando un intermediario polipirrólico inestable de cadena abierta, el 1-hidroximetilbilano (HMB) (Battersby et al., 1979a; Burton et al., 1979). En ausencia de Isomerasa, el HMB se cicla no enzimáticamente para producir el UROgen I. Ni el PBG ni el UROgen I son sustratos de la Isomerasa. Esta interviene en la segunda etapa reordenando el anillo pirrólico D, para generar el isómero asimétrico UROgen III (Jordan et al., 1979; Battersby & Leeper, 1990). Este porfirinógeno constituye el precursor común en los caminos biosintéticos del hemo, la clorofila y las cobalaminas (Jordan, 1990; Battersby & Leeper, 1990; Warren & Jordan, 1990; Jordan y Woodcock, 1991). La concentración de Isomerasa, generalmente en exceso, determina la relación del UROgen de tipo III a tipo I formado.

La PBGasa es una enzima sulfhidrónica localizada en el citoplasma, si bien se ha encontrado actividad en fracciones de particulado de *Euglena gracilis* (Rossetti & Batlle, 1977). Esta enzima ha sido purificada de diversas fuentes, animales, plantas o bacterias, y también se han estudiado sus propiedades (Batlle & Rossetti, 1977; Rossetti et al., 1980, 1986; Batlle, 1986; Juknat et al., 1989, b; Araujo et al., 1989, 1994; Fumagalli et al., 1991).

La fuerza iónica y la presencia de ciertos compuestos modifican el comportamiento de la Isomerasa (Sancovich et al., 1969a; Llambías & Batlle, 1971a, b; Batlle & Rossetti, 1977) indicando que, dependiendo de las condiciones experimentales puede ocurrir una asociación de varias unidades de Isomerasa, lo

que justificaría la variedad de pesos moleculares reportados para esta enzima (Rossetti et al., 1980).

Los estudios cinéticos de la PBGasa indican que esta enzima es alostérica (Batlle & Rossetti, 1977), y contiene al menos dos sitios de unión para el sustrato por molécula de enzima; en algunos casos presenta cooperatividad positiva o negativa o una combinación de ambas (Sancovich et al., 1969b; Llambías & Batlle, 1970a, b; Llambías et al., 1971) indicando que la PBGasa es regulada por sus sustratos.

I.4.2. Porfobilinógeno-Deaminasa

Como se ha descrito en el ítem I.4.1. la PBG-D cataliza estereoespecíficamente (Jones et al., 1984; Schauder et al., 1987) la deaminación y la polimerización de cuatro moléculas de PBG para formar el intermediario de cadena abierta HMB mediante un mecanismo ordenado en el sentido de las agujas del reloj, donde primero se une el anillo A, luego el B, el C y finalmente el D (Jordan & Sheera, 1979; Battersby et al., 1979b) (Figura I-I.5.).

La importancia de esta enzima radica en ser la que genera la primer estructura tetrapirrólica. Por una deficiencia primaria de esta proteína se produce una disminución en la síntesis de hemo y una acumulación de precursores. Por otro lado la PBG-D cumpliría un rol regulatorio secundario en la biosíntesis de porfirinas, ya que en ciertas condiciones la actividad de la misma se convierte en otro paso limitante de la velocidad de síntesis de hemo debido a su muy baja actividad en hígado (Moore et al., 1980; Kappas, 1983)

La PBG-D se purificó tanto de organismos procariotas como de eucariotas incluyendo eritrocitos de pollo (Llambias et al., 1971), eritrocitos humanos (Anderson & Desnik, 1980; Fumagalli et al., 1985), hígado bovino (Sancovich et al., 1969b), callos de

soja (Llambias & Batlle, 1971a), hígado de rata (Mazzetti & Tomio, 1988), hígado humano (Mazzetti & Tomio, 1990), glándula de Harder (Cardalda et al., 1995), *Euglena gracilis* (Rossetti et al., 1980; Williams et al., 1981), *Rhodopseudomonas sphaeroides* (Jordan & Shemin, 1973), *Rhodopseudomonas palustris* (Kotler et al., 1987a, b, 1990); *Scenedesmus obliquus* (Juknat et al., 1994) *Arabidopsis thaliana* (Jones & Jordan, 1994), *Escherichia coli* (Thomas & Jordan, 1986; Hart et al., 1986) y *Saccharomyces cerevisiae* (Correa García et al., 1991). También se aisló de plantas como espinaca (Higuchi & Bogorad, 1975) y arveja (Spano & Timko, 1991).

La PBG-D ha sido obtenida en diferentes formas, que corresponden tanto a la enzima nativa como complejada con su sustrato, originándose así intermediarios estables mono-, di-, tri- y tetrapirrólicos (Llambias & Batlle, 1971b; Stella et al., 1971; Rossetti & Batlle, 1977; Rossetti et al., 1977; Warren & Jordan, 1988; Kotler et al., 1991).

En todas las fuentes estudiadas esta enzima parece ser monomérica, con un peso molecular de 40000 ± 6000 Da (Llambias & Batlle, 1971a,b; Jordan & Shemin, 1973; Sancovich et al., 1976; Rossetti et al., 1980; Mazzetti & Tomio, 1990). El pH óptimo varía entre 7,2 y 8,4 (Anderson & Desnick, 1980; Mazzetti & Tomio, 1988; Spano & Timko, 1991; Correa García et al., 1991; Jones & Jordan, 1994). Como la mayoría de las enzimas del camino biosintético del hemo la PBG-D es una proteína sulfhidrúlica; los inhibidores de tioles afectan la formación de porfirinas ya que estos grupos estarían involucrados en la ciclación del HMB.

Los estudios cinéticos indicaron que la PBG-D exhibe una curva de saturación del tipo de Michaelis-Menten con un K_m aparente 20 ± 4 μM (Sancovich et al., 1969b; Jordan & Shemin, 1973; Anderson & Desnick, 1980; Kotler et al., 1987a; Mazzetti & Tomio, 1988; Correa García et al., 1991; Jones & Jordan, 1994). Además

se propuso la existencia de un único sitio de unión para el sustrato (S) y otro para el cofactor (C) (Warren & Jordan, 1988).

Esta enzima es fotosensible (Frydman & Frydman, 1970; Frydman & Feinstein, 1974), se inactiva por agentes químicos que oxidan los residuos triptofano de la proteína (Frydman & Frydman, 1973).

Se postuló la presencia de un factor de bajo peso molecular que modifica la actividad de la PBG-D (Sancovich et al., 1969b; Piper & Tephly, 1974, Tephly, 1975). Asimismo, los derivados de grupo pteridilo estimulan su actividad (Piper & Van Lier, 1977; Juknat et al., 1981; Christenson et al., 1986; Noriega et al., 1992) este activador podría actuar como una coenzima o como un compuesto que controla la conversión enzimática del PBG a porfirinógenos. Paralelamente se demostró en *Euglena gracilis*, la existencia de un factor termoestable de bajo peso molecular y que puede ser reemplazado por el ácido fólico (Juknat et al., 1981). Posteriormente, este factor fue purificado (Juknat et al., 1988a) y se demostró que su estructura correspondía a la de una 6-biopterina (Juknat et al., 1988b) y que regula las actividades de la PBGasa y de la PBG-D. Por otra parte se sugirió la existencia de un sitio de unión para el folato sobre la PBG-D (Christenson et al., 1986; Kotler et al., 1988b).

Así también, varias sulfonamidas inhiben *in vitro* a la PBG-D hepática (Peters et al., 1980) y a la de sangre (Kotler et al., 1988a) observándose este efecto en ausencia o deficiencia de isomerasa, lo cual sugeriría que esta última enzima cumpliría un rol protector en el funcionamiento del complejo, produciéndose así el intermediario fisiológico UROgen III (Sancovich et al., 1969a).

El cDNA de la PBG-D se ha clonado y secuenciado a partir de diversos organismos incluyendo *Escherichia coli* (Thomas & Jordan, 1986), eritrocitos humanos (Raich et al., 1986), bazo de rata

(Stubnicer et al., 1988), ratón (Beaumont et al., 1989), *Euglena gracilis* (Sharif et al., 1989), *Bacillus subtilis* (Petricek et al., 1990) y líneas celulares humanas (Grandchamp et al., 1987).

De estos estudios se determinó que es una enzima estructuralmente conservada y además que el gen de la PBG-D es transcrito desde dos diferentes promotores y del ARNm surgen dos isoenzimas, una característica de células no eritroides y otra de tejido eritropoyético.

I.4.3. Mecanismo de reacción

La secuencia exacta de los pasos que involucran el ensamble del HMB en la PBG-D fueron motivo de varias investigaciones (Jordan & Warren, 1987; Warren & Jordan, 1988). La PBG-D es la única enzima que utiliza un cofactor dipirrometano como un "primer" al que se le unen covalentemente las cuatro moléculas de PBG (Jordan & Warren, 1987; Hart et al., 1987; Warren & Jordan, 1988). Este cofactor está unido a la apoenzima monomérica y se forma a partir de dos moléculas de PBG, denominadas C1 y C2. La elongación de la cadena polipirrólica se produce por la deaminación secuencial de cada pirrol con la formación de uniones C-C. La primer molécula de PBG, C1, del cofactor se une al grupo sulfhidrilo desprotonado de una cisteína en la posición 242 y 254 en la PBG-D de *Escherichia coli* y *Arabidopsis thaliana* respectivamente (Jordan et al., 1988; Miller et al., 1988; Scott et al., 1988; Jones & Jordan, 1994) a través de una unión covalente (Figura I-I.4.).

La cristalización de la PBG-D de *E. coli* (Jordan et al., 1992) y la determinación de su estructura tridimensional (Louie et al., 1992) han permitido dilucidar el mecanismo de la polimerización enzimática del PBG.

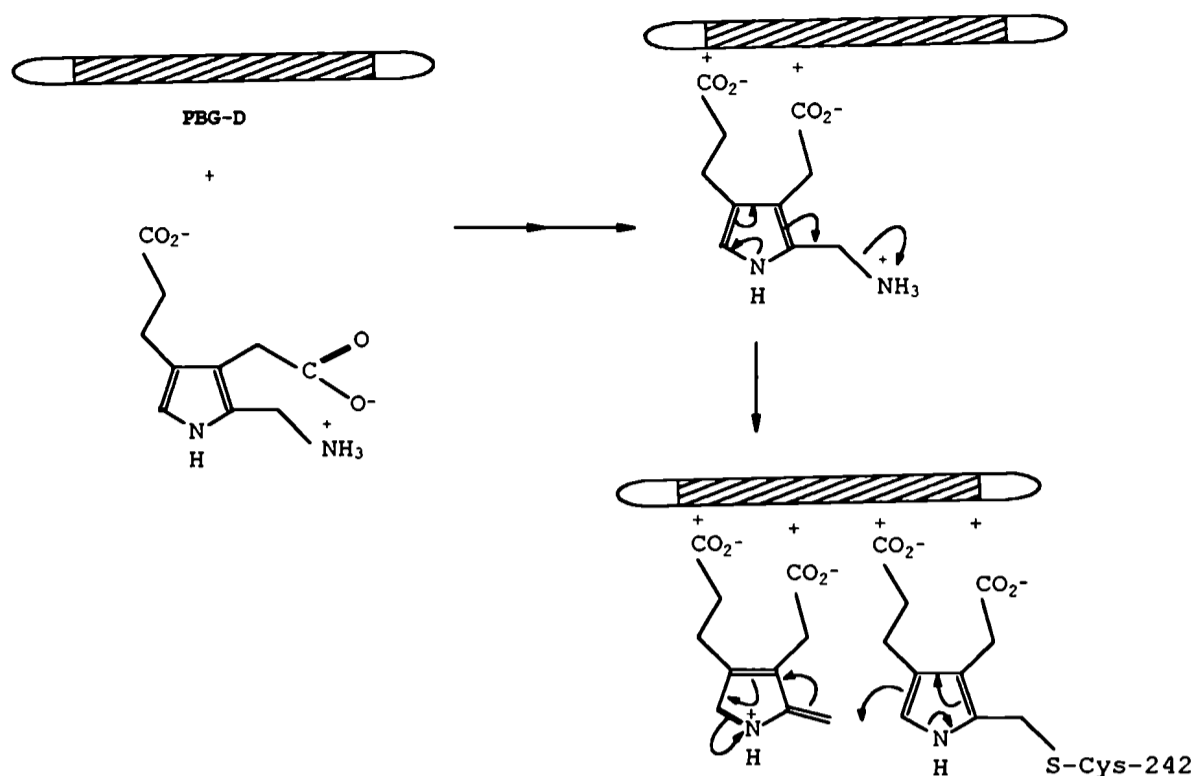


FIGURA I-I.4.: Disrupción intermolecular del PBG y su unión a grupos positivos de la enzima

Por otra parte, los estudios de mutagénesis a sitio dirigida de la PBG-D de *E. coli* (Jordan & Woodcock, 1991; Lander et al., 1991) establecieron el rol que cumplen los doce residuos arginina (Arg) presentes en número invariable en diversos organismos. Estos unirían las doce cadenas laterales carboxílicas cargadas negativamente, acetato y propionato, del dipirrometano y de los cuatro anillos de PBG a través de uniones salinas o por puentes de hidrógeno. Estas Arg se ubican, en la PBG-D de *E. coli*, en las posiciones 131, 132 y 155 correspondientes al sitio C, donde se une el cofactor, y en 11, 149 y 155 del sitio S, donde se produce la elongación.

Además este mismo tipo de estudio reveló la importancia de un residuo aspartato (Asp), en la posición 84, en el mecanismo catalítico (Woodcock & Jordan, 1994) por estar ubicado cerca del sitio S y C. Así el Asp-84 puede estabilizar la carga positiva generada sobre el átomo de N del azafulveno y del pirrol nucleofílico ya que provee dos cargas negativas debido a su naturaleza bicarboxílica (Gandour, 1981).

El mecanismo catalítico involucra la reacción de condensación a través de la deaminación del PBG en el sitio S para producir un azafulveno (o especie equivalente) que actúa como electrófilo para atacar a la posición nucleofílica α no sustituida de un anillo pirrónico unido a la enzima. Este puede ser el anillo C2 del dipirrometano o la unidad terminal del complejo enzima-intermediario, ES, ES₂ o ES₃ localizados en el sitio C (Figura I-I.5.A.).

Se han propuesto diversas hipótesis para explicar el mecanismo de reacción de la PBGasa, pero a partir de los estudios de esta enzima de callos de soja (Llambías & Batlle, 1970c) se pudo determinar la existencia de intermediarios polipirrónicos de cadena abierta; confirmándose luego con los resultados obtenidos con la enzima de *Euglena gracilis* (Rossetti & Batlle, 1977; Rossetti et al., 1977), de *Rhodospseudomonas palustris* (Kotler et al., 1991) y de *Saccharomyces cerevisiae* (Correa García et al., 1995).

Estudios cinéticos han sugerido que la conversión de PBG en UROgen III o I ocurre en dos pasos, el primero consiste en la formación del intermediario polipirrónico y el segundo en la ciclación produciéndose el UROgen correspondiente (Llambías & Batlle, 1971a; Stella et al., 1971; Rossetti & Batlle, 1977; Rossetti et al., 1977) planteándose así el siguiente mecanismo (Figuras I-I.5.A y I-I.5.B.) propuesto por Battersby & Leeper (1990).

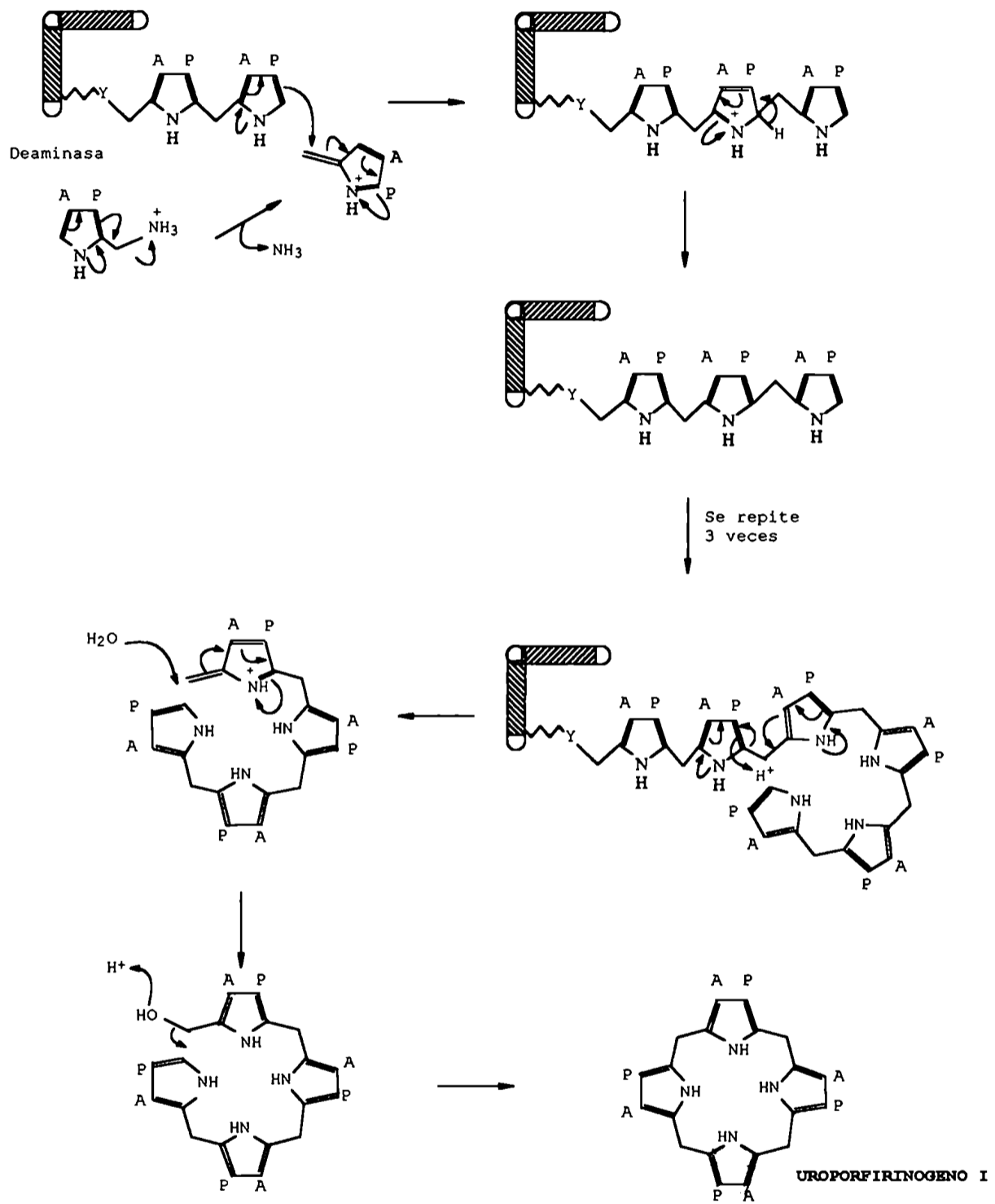


FIGURA I-I.5.A.: Mecanismo de formación del uroporfirínogeno I

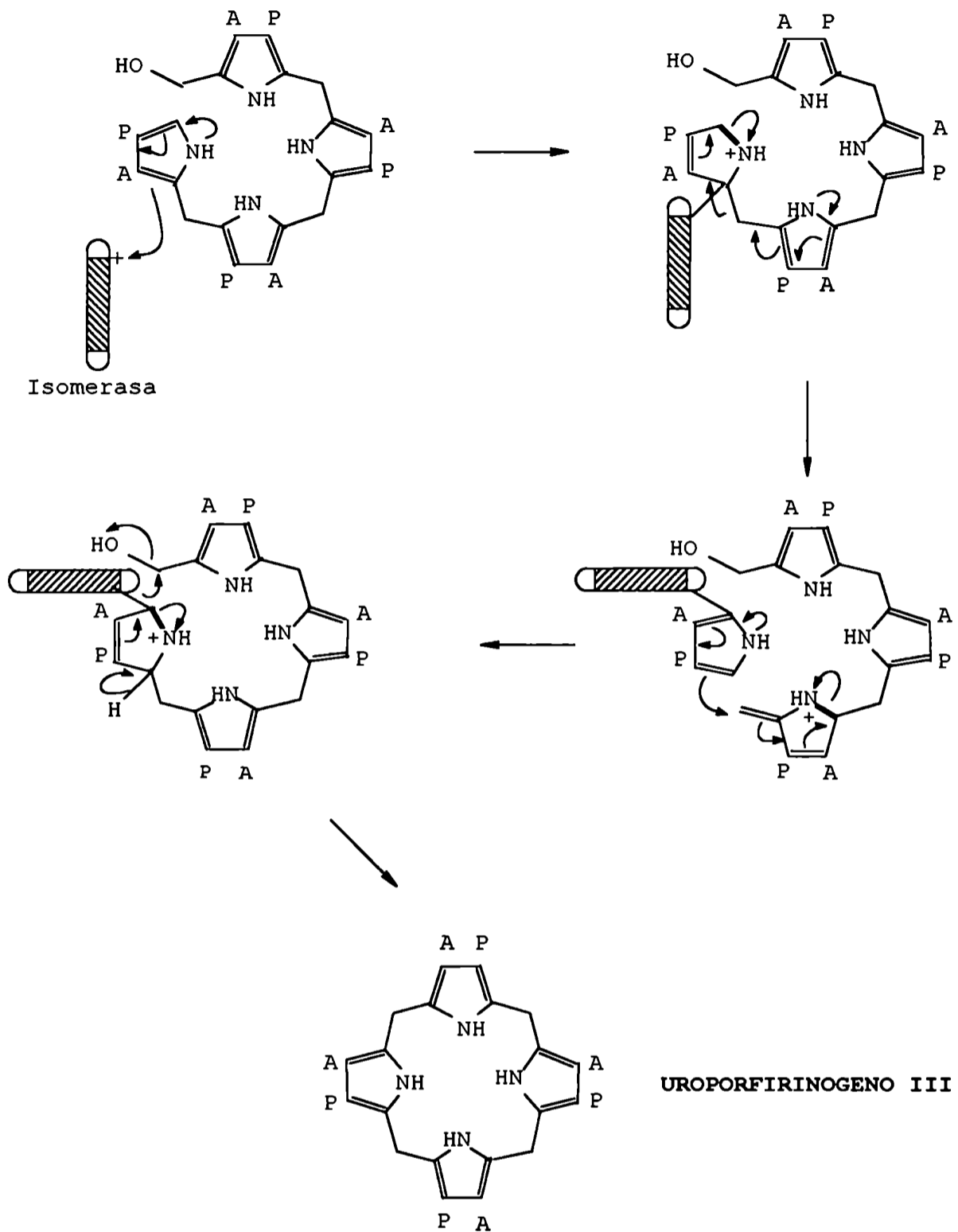


FIGURA I-I.5.B.: Mecanismo de formación del uroporfirinógeno III

I.5. Regulación de la síntesis del hemo

La naturaleza esencialmente dinámica de los seres vivos, así como de sus células constituyentes, determina la existencia de mecanismos que aseguran un perfecto equilibrio entre las miles de reacciones metabólicas que tienen lugar en los organismos vivientes. Este control se lleva a cabo a diferentes niveles y de

varias formas, dependiendo de su eficiencia se pueden o no expresar diversas patologías.

La biosíntesis de porfirinas, atributo de todas las células, responde a esta regla general, a juzgar por las cantidades relativas de las mismas y sus precursores que se forman y excretan por día.

La existencia de una serie de controles está ligada al rendimiento, lo que hace que en la síntesis de hemo la pérdida total sea menor del 5%, pero si estos mecanismos fallan o son defectuosos la síntesis o acumulación de intermediarios en el camino biosintético del hemo puede alcanzar niveles mayores que los fisiológicas, con serias consecuencias para el organismo todo. Estos desórdenes dan origen a las patologías denominadas porfirias.

I.5.1. Mecanismos de control

Se han postulado diferentes mecanismos que contribuyen a ese preciso control de la biosíntesis del hemo.

Entre los múltiples controles de los cuales puede disponer la célula para regular su contenido de tetrapirroles, se encuentran:

- (1) Localización intracelular y tisular.
- (2) Efecto de los constituyentes del medio ambiente o del medio celular (oxígeno, luz, estado redox).
- (3) Interconexión con otros caminos metabólicos.
- (4) Cambios en la actividad y cantidad de la enzima limitante ALA-S.
- (5) Por metabolitos de su síntesis.

(1) Observando la localización intracelular de las enzimas del camino biosintético del hemo y teniendo en cuenta que ciertas etapas tienen lugar en la mitocondria y otras en el citoplasma,

los intermediarios así formados deben atravesar las membranas mitocondriales. Esto podría constituir de por sí un mecanismo regulatorio, incluso se ha postulado la existencia de permeasas específicas (Granick, 1966; Granick & Sassa, 1971; Elliot, 1993).

Por otro lado, se sabe que los niveles de hemoproteínas varían considerablemente en los distintos tejidos y existen evidencias de que las células de cada tejido son capaces de sintetizar sus propias proteínas hémicas de novo, de acuerdo además con sus necesidades específicas.

(2) La tensión de oxígeno y el estado redox de la célula también influyen diferencialmente las actividades de este camino metabólico. Así, el pasaje de COPROgen III a PROTOgen IX es una reacción necesariamente aeróbica, mientras que la inserción de hierro en la PROTO-IX para dar hemo se ve favorecida por condiciones anaeróbicas.

En bacterias fotosintéticas, la iluminación desempeña un rol importante en las fases de crecimiento.

(3) Los mecanismos de regulación del hemo se encuentran muy bien coordinados, por ejemplo, con los de formación de las proteínas específicas que constituyen las distintas hemoproteínas. La concentración intracelular de ALA está relacionada con el ciclo de los ácidos tricarbónicos.

El estado redox, los niveles de NAD(P)H y ATP celular, son otros factores que participan asimismo en el control de este camino.

(4) Uno de los controles fundamentales lo constituye el cambio de actividad del ALA-S. Hay dos mecanismos generales por medio de los cuales se puede controlar la actividad de una enzima: a) uno rápido, que implica modificaciones directas en la

actividad catalítica, y b) otro más lento, por cambios en la cantidad de la enzima.

a) Este tipo de control rápido cualitativo se conoce como control por "feedback" o control por retroinhibición . Es decir que cuando la concentración de hemo en la célula supera los niveles normales inhibe directamente al ALA-S (Lascelles, 1964; Marks, 1969).

Generalmente se acepta que la regulación de la biosíntesis del hemo está gobernada por la actividad del ALA-S, la primer enzima del camino y la que tiene velocidad limitante (Granick & Urata, 1963; Granick, 1966; Marver et al., 1966).

b) El mecanismo que se ha postulado para explicar la formación y control del ALA-S se basa en la conocida hipótesis de Jacob y Monod (Figura I-I.6.)

El gen estructural del operón hemo, una porción del ADN cromosómico nuclear que lleva la información para la síntesis del ALA-S, se activa por medio de un gen operador, que a su vez responde a la presencia de un represor activo, el cual normalmente actúa reprimiendo este gen operador, que detiene entonces la producción de ARN mensajero por parte del gen estructural que codifica el ALA-S y en consecuencia se interrumpe su síntesis.

El gen regulador produce una molécula proteica o apo-represor que cuando se combina con su co-represor, en este caso el hemo, da lugar al represor activo. Cuando el hemo no puede unirse al apo-represor, ya sea porque su concentración es baja o bien porque su sitio de unión está bloqueado, no se forma el represor activo que por lo tanto no puede actuar sobre el gen operador; como consecuencia se dispara o recomienza la síntesis del ALA-S, a máxima velocidad.

Asociada al concepto de que el control de la síntesis de porfirinas depende del nivel del ALA-S, se encuentra la idea de que la cantidad formada de esta enzima debe variar como respuesta a ciertos estímulos o necesidades. Así es posible reprimirla o inducirla por acción de ciertos compuestos fisiológicos, farmacológicos y químicos, modificando la afinidad entre el hemo y el apo-represor o bien alterando el destino metabólico del mismo disminuyendo la concentración celular con la consecuente indisponibilidad del co-represor.

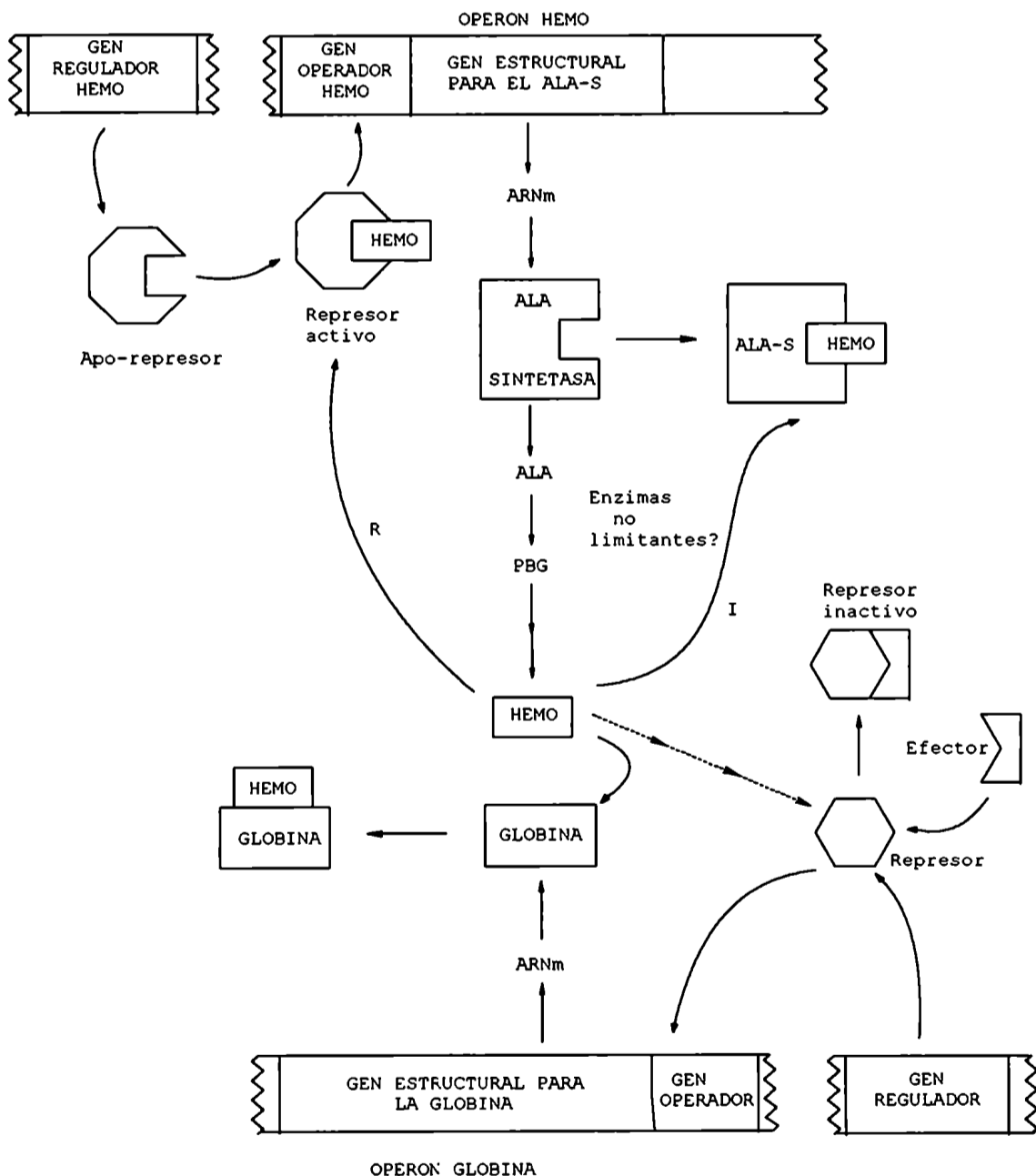


FIGURA I-I.6.: Mecanismo de regulación; I: Por inhibición de la actividad del ALA-S por producto final; R: Por represión de la síntesis proteica del ALA-S.

(5) El pool de hemo intracelular altera la densidad de receptores de transferrina sobre células eritroides en desarrollo, regulando así la captación de hierro (Ponka et al., 1974).

I.6. Desórdenes en la biosíntesis del hemo

I.6.1. Generalidades y clasificación

Las porfirias son una familia de desórdenes, heredados o adquiridos, del metabolismo de las porfirinas producidos por un defecto parcial de una de las enzimas del camino biosintético del hemo, en los cuales las manifestaciones clínicas y bioquímicas están relacionadas con el tejido donde la disfunción metabólica está presente y se expresa con mayor intensidad.

Cada tipo de porfiria tiene un patrón característico de los precursores (ALA y PBG) y/o porfirinas en sangre y excreta (Batlle et al., 1981). Esta distribución particular está determinada por el sitio del bloqueo enzimático.

La clasificación en términos del tejido donde se ubica la deficiencia enzimática da origen a las porfirias "hepáticas" y "eritropoyéticas"; pero si se refiere a las principales manifestaciones clínicas las porfirias se clasifican en "agudas" y "no agudas" (Moore et al., 1987) y "cutáneas" y "no cutáneas" (Tabla I-I.2.).

TABLA I-I.2.: Clasificación de las porfirias

Hepáticas

Porfiria aguda intermitente (PAI)

Porfiria deficiente en ALA-D (PALADd)

Porfiria variegata (PV)

Coproporfiria hereditaria (CPH)

Porfiria cutánea tarda (PCT)

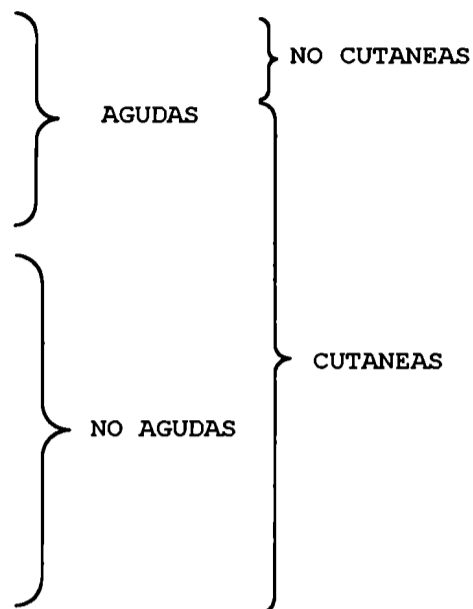
Eritropoyéticas

Protoporfiria eritropoyética (PPE)

Porfiria congénita eritropoyética (PCE)

Hepato-eritropoyética

Porfiria hepato-eritropoyética (PHE)



En seis de las ocho porfirias la manifestación clínica primaria es la fotosensibilidad cutánea, producida por acción de la luz sobre las porfirinas, que se acumulan en la capa epidérmica superior de la piel.

En las restantes los enfermos pueden experimentar disfunciones neuroviscerales normalmente caracterizadas por dolores abdominales, neuropatía periférica y disturbios psiquiátricos. Los ataques agudos en estos pacientes pueden alcanzar un riesgo de mortalidad del 10%.

Como se ha descrito las porfirias se producen por alteraciones en la función de las enzimas del camino metabólico de las porfirinas y particularmente en la PAI la afección se localiza a nivel de la PBG-D (Strand et al., 1970; Batlle & Rossetti, 1977).

I.6.2. Porfiria Aguda Intermitente

La PAI se caracteriza porque presenta estados de exacerbación y remisión de la sintomatología, por lo cual se la ha denominado Porfiria Aguda Intermitente.

En esta patología el disturbio del metabolismo de las porfirinas se expresa fundamentalmente en hígado. La PAI puede exhibir sintomatología gastrointestinal y neurológica con ausencia de lesiones dermatológicas dado que no hay fotosensibilización. El ALA y el PBG son excretados por orina en grandes cantidades (Sachs, 1937), ésta adquiere un color oscuro, tanto en la fase aguda como en el estado latente de la enfermedad luego de ocurrida una crisis. Esto indica que el defecto primario se encuentra a nivel de la PBG-D con la consecuente acumulación de su sustrato, PBG, disminución de la velocidad de síntesis del hemo, aumento secundario de la actividad del ALA-S y de la cantidad de su producto ALA.

Se demostró que en pacientes con PAI, la PBG-D hepática estaba reducida en un 50% con respecto a los valores hallados en individuos normales, esta disminución se detecta tanto en pacientes con PAI sintomática como latente (Heilmeyer & Clotten, 1969; Strand, 1970); posteriormente se pudo establecer que la actividad de esta enzima también se encontraba disminuída en eritrocitos (Meyer et al., 1972; Strand et al., 1972; Sassa et al., 1974, 1975, 1978; Batlle & Rossetti, 1977), en cultivos de fibroblastos y otros tejidos (Meyer, 1973; Bonkowsky et al. 1973). Además, como se ha indicado en la PAI se observa un incremento secundario de la actividad del ALA-S hepática por ausencia de los efectos de "feedback" y de represión enzimática (Tschudy et al., 1965; Nakao et al., 1969; Sweeney et al., 1970) (Figura I-I.7.).

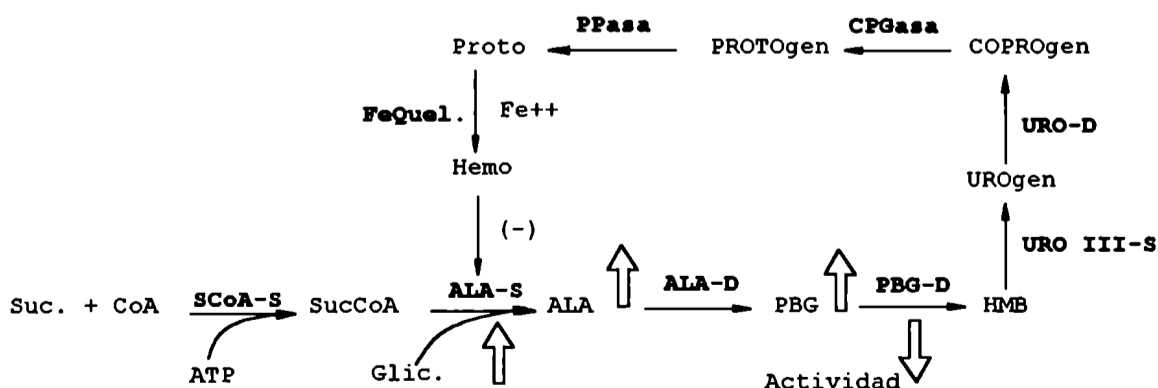


FIGURA I-I.7.: Relación entre el incremento de actividad del ALA-S y la disminución de la PBG-D en pacientes con PAI.

La PAI es una enfermedad hereditaria, genéticamente relacionada con la condición de una irregularidad mendeliana de carácter autosómico dominante, por lo cual debe expresarse en personas heterocigotas para un gen normal.

Hay una preponderancia de pacientes de sexo femenino, más frecuentemente en las mujeres en su tercera y cuarta década de vida y en los hombres luego de los cuarenta años.

Diferentes drogas como por ejemplo: barbitúricos, anticonceptivos, alcohol, drogas del grupo de las sulfas (sulfonamidas) pueden desencadenar esta patología, que se identifica como una enfermedad farmacogenética.

Las características clínicas se dividen en tres grupos:

- a) signos gastrointestinales.
- b) disturbios cardiovasculares.
- c) sintomatología neurológica.

a) Los pacientes presentan dolores abdominales solos o asociados a constipación. El dolor es predominantemente por cólicos, situado principalmente en el epigastro. Estos pueden estar acompañados tanto por vómitos como diarreas.

b) Durante la fase aguda de la enfermedad pueden presentarse casos con taquicardia o hipertensión.

c) Los enfermos presentan conjuntamente síntomas neurológicos y psicológicos. La mayoría de los pacientes tienen disturbios motores por la lesión de motoneuronas, con parálisis y parestesias de extremidades y músculos (respiratorios, deglutorios y faríngeos), deterioro sensorial del tipo analgésico, con pérdida de la sensación articular y vibratoria. Los enfermos pueden presentar ataques epilépticos de origen desconocido. Los síntomas mentales se clasifican en: depresión, ansiedad, nerviosismo, histeria, confusión, alucinaciones o cambios en la personalidad y en algunos casos se puede llegar al coma.

Como todos los desórdenes de tipo agudo las manifestaciones clínicas de la PAI son debidas a las disfunciones o a la muerte de las neuronas. Como se ha descrito los síndromes son:

(1) Crisis con dolores agudos por disfunciones del sistema nervioso autónomo.

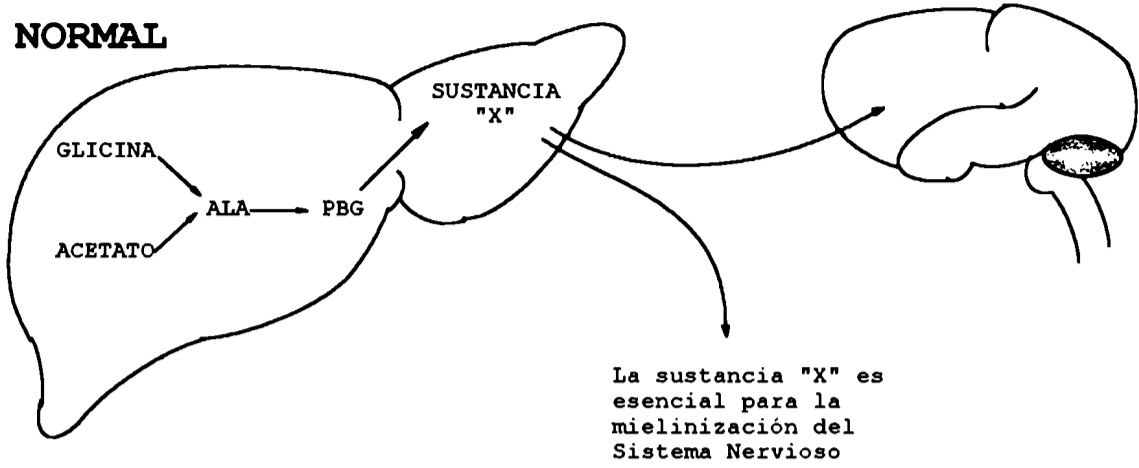
(2) Neuropatía motora periférica. Estos ataques pueden progresar con el compromiso de nervios craneales y troncales y con la disfunción del Sistema nervioso central (SNC), incluyendo delirio, coma y muerte.

(3) Dolores subagudos o crónicos y parestesias.

Cuando los ataques son severos, la neuropatía motora va acompañada de síntomas y signos de debilidad muscular (Goldberg, 1959; Kappas et al., 1983), afectando inicialmente a las extremidades, para luego comprometer a los nervios troncales y craneales con las disfunciones subsecuentes que estos conllevan. En algunos casos se observan dolores musculares con calambres, reducción de la tonicidad muscular y disminución de los reflejos. Es característico en los pacientes con esta patología que presenten alterados los diversos parámetros clínicos que se han indicado por algunos días para, recuperarse rápidamente en los siguientes, lo que sugiere que los nervios motores están sufriendo degeneración axonal y subsecuente regeneración.

Basándose en autopsias y material de biopsias, se concluyó que la lesión axonal sería el primer evento causante de la disfunción neurológica (Ten Eyck et al., 1961; Cavanagh & Mellick, 1965; Sweeney et al., 1970). En varios casos de PAI se ha demostrado también, histológicamente, la degeneración del eje cilíndrico y la desmielinización de neuronas del cerebelo (Gibson & Goldberg, 1956; Ten Eyck et al., 1961) (Figura I-I.8., Goldberg, 1959; Murphy, 1964).

NORMAL



PORFIRIA AGUDA

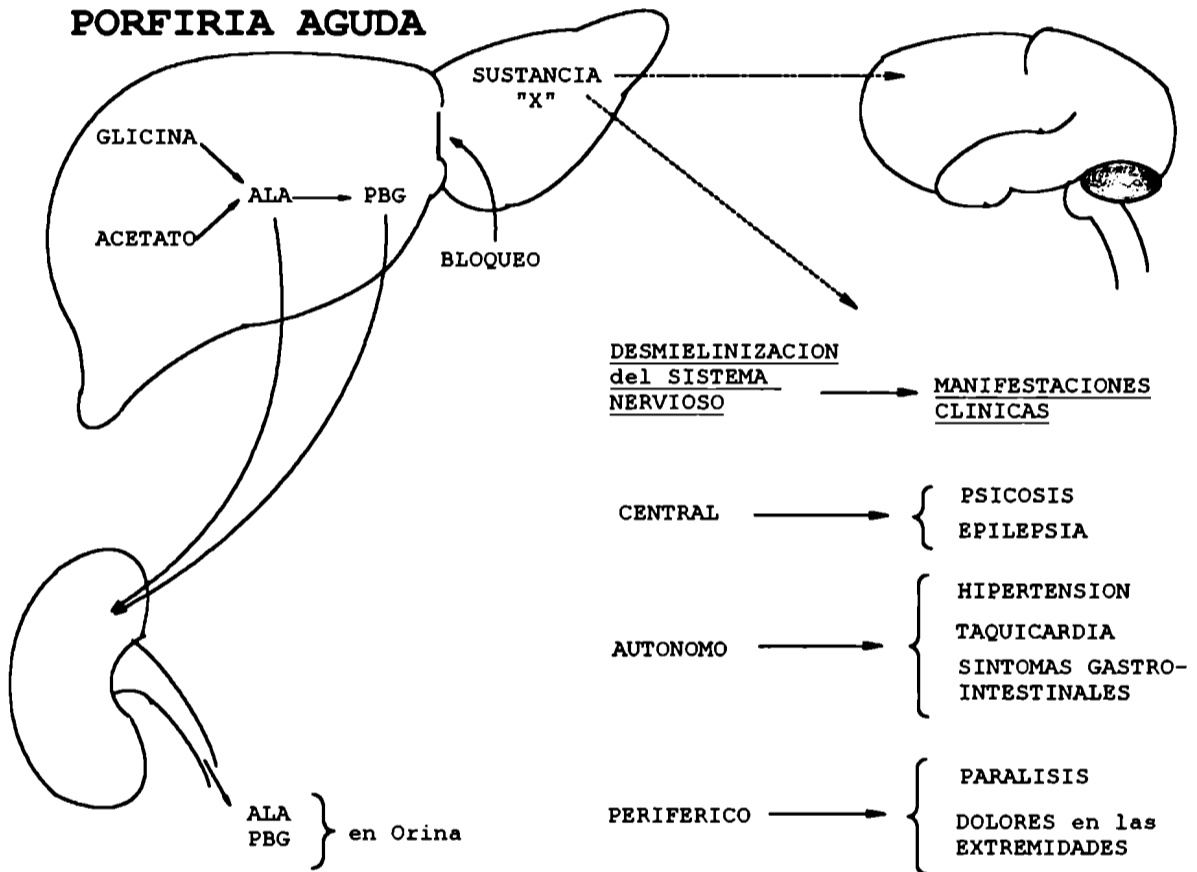


FIGURA I-I.8.: Esquema hipotético de la patogénesis de la porfiria aguda intermitente.

Varias hipótesis se han planteado para explicar la patogénesis de las manifestaciones neurológicas de la PAI, incluyendo las siguientes:

(1) Disminución de sustratos o cofactores esenciales, como resultado de la biosíntesis anormal del hemo.

El contenido de vitamina B₆, el fosfato de piridoxal cofactor de la enzima ALA-S, está disminuido durante los ataques

agudos, debido a que al estar incrementada la actividad de esta enzima en el hígado, aumenta el consumo de este cofactor, con la consecuente disminución del suministro al tejido nervioso y a los músculos, generando la sintomatología neurológica (Price et al., 1959; Cavanagh & Ridley, 1967). Por otra parte, los pacientes con PAI muestran un incremento en la excreción urinaria de zinc, que acompaña con preferencia a las porfirinas dado que éstas poseen gran capacidad quelante de iones metálicos divalentes (Roman, 1969; Peters et al., 1974). Esta disminución de los niveles de zinc, el que actúa como cofactor de varias enzimas, entre ellas la lactato deshidrogenasa, produciría la acumulación de ácido láctico en músculos, originando dolores y calambres (Peters, 1960; Peters et al., 1974). Por otro lado al estar aumentada la actividad del ALA-S, se reduce la concentración de glicina. Así se disminuye su aporte a otras reacciones como la síntesis de acetilcolina, cuya reducción se relacionó con las manifestaciones neurológicas de la PAI (De Matteis & Rimington, 1962; Neuberger, 1980).

(2) Disturbios metabólicos ajenos al camino biosintético del hemo.

La disminución hepática de ATP (De Matteis & Rimington, 1962) y el deterioro de la oxidación mitocondrial de NADH (Gajdos & Gajdos-Török, 1969) privaría a los tejidos nervioso y muscular de su fuente principal de energía para el mantenimiento normal de la actividad mitocondrial.

(3) Productos anormales derivados de ALA y PBG.

La presencia en orina de compuestos semejantes al PBG (Irvine et al., 1969) como porfobilina y kriptopirrol, con actividad neurotóxica (Irvine, 1961) podrían estar relacionados con los síntomas nerviosos en pacientes con PAI.

(4) Neurotoxicidad ejercida por el ALA y PBG.

La característica común de todos los tipos de porfiria aguda, de la intoxicación por plomo y de la tirosinemia hereditaria es la sobreproducción y excreción urinaria de ALA (Moore et al., 1979). El PBG está también aumentado en 3 de las 4 porfirias agudas así, no lo está en la deficiencia homocigota del ALA-D (Bird et al., 1979). De manera que el rol patogénico del PBG es dudoso y no hay evidencias de que éste tenga alguna actividad farmacológica (Goldberg, 1959). Los pacientes con el defecto homocigótico descrito en la porfiria ALA-D deficiente acumulan grandes cantidades de ALA pero no de PBG, presentando en cambio las mismas manifestaciones neurológicas observadas para las otras porfirias agudas (Bird et al., 1979; Doss et al., 1982).

El exceso de precursores está usualmente relacionado con su generación en el hígado, aunque la sobreproducción *in situ* dentro de las neuronas o gliales no está excluida. Para que los precursores puedan ejercer su efecto y actúen como neurotóxicos se requiere que atraviesen la barrera hematoencefálica (BHC); se determinó que el ALA cruza la BHC *in vivo* durante el ataque agudo (McGillion et al., 1974), sin embargo en pacientes con PAI los niveles de ALA y PBG en el fluido cerebro espinal (FCE) es de 10^{-5} a 10^{-7} M, valores menores que los existentes en suero (Sweeney et al., 1970; Bonkowsky et al., 1971; Percy & Shanley, 1977).

Hay evidencias que el ALA se concentra en cortes de cerebro y cultivos de neuronas (Becker et al., 1974; Percy & Shanley, 1979; Percy et al., 1981) en una concentración mayor a la presente en el FCE de lo cual surge la posibilidad que se acumule en el tejido nervioso, o bien debido al exceso de ALA circulante o por disminución de la actividad de la PBG-D.

Otra posibilidad es que el ALA y el PBG cumplan un rol neurotóxico a partir de formación directamente en neuronas y/o

gliales, a raíz de la existencia de una respuesta similar a la observada en el tejido hepático de las enzimas ALA-S y PBG-D presentes en estas células. Se ha medido la actividad de ALA-S en cerebro entero de rata (Gibson & Goldberg, 1970; Barnes et al., 1971; De Matteis et al., 1981) y en varias regiones del mismo (Percy & Shanley, 1979; Maines, 1980); como en otros tejidos, la actividad de esta enzima es muy baja con respecto a la de otras del camino biosintético del hemo, por lo que la velocidad de síntesis de las porfirinas también está aquí controlada por la producción de ALA.

Si la síntesis del hemo en el tejido nervioso humano se asemeja al de la rata, cuando la actividad de PBG-D esté disminuída apreciablemente, ésta podría transformarse en una enzima limitante para la síntesis. Una disminución de la actividad de la misma dañaría las neuronas por déficit de hemo (ver hipótesis 5) y/o produciría una acumulación de ALA o PBG dentro del tejido nervioso.

Surgen así varias preguntas: a) Es inducible el ALA-S del tejido nervioso?, b) Qué controla los niveles de actividad de ALA-S en este tejido?, c) Existe el feedback ejercido por el hemo sobre el ALA-S como en otros tejidos? y d) Las drogas desencadenantes de porfiria clínica y experimental, inducen al ALA-S?.

Hasta el momento las respuestas a los anteriores interrogantes son las siguientes: Los niveles del ALA-S cerebral pueden controlar la demanda de hemo. El ALA-S puede ser inducida, sin embargo, las drogas que producen porfiria hepática experimental o que exacerban la porfiria hepática aguda humana no afectan esta ALA-S, ni la homeostasis del hemo cerebral. Aparentemente estas drogas tendrían su efecto primario en el hígado. Esta acción está justificada por cuanto los ataques agudos ocurren sólo cuando la excreción de ALA y PBG está aumentada lo cual solo ocurre durante los ataques; por otro lado,

la administración directa de ALA y PBG dentro de los ventrículos cerebrales de rata, produce efectos excitatorios (Shanley et al., 1975, 1976).

Este tipo de manifestaciones neurológicas se ha observado también en pacientes con deficiencia de ALA-D por sobreproducción de ALA y no de PBG. Además, en algunos enfermos con tirosinemia hereditaria e intoxicación con plomo que muestran signos neurológicos similares a los de la PAI también se encuentra acumulación de ALA pero no de PBG.

Existen numerosas evidencias que establecen que el ALA actúa como neurotóxico. Así el ALA (0,2 - 8,0 mM) disminuye la contracción espontánea y la tonicidad muscular del duodeno aislado de conejo (Cutler et al., 1980). Este efecto persiste aún cuando la transmisión neural se bloquea con tetradotoxina.

Por otro lado, el ALA interfiere en la liberación de neurotransmisores; así inhibe la de acetilcolina, estimulada por Na^+ y K^+ en preparados de nervio frénico de rata (Feldman et al., 1968) como también la producida por el impulso nervioso (Bornstein et al., 1979).

El ALA (0,1 - 10 mM) deprime la actividad sináptica espontánea y estimulada eléctricamente de médula espinal de rana (Nicoll, 1976), además de despolarizar las fibras neuromusculares de rana (Becker et al., 1975). Estos hallazgos están entonces sugiriendo el posible compromiso del ALA en los efectos clínicos a nivel sináptico.

Sin embargo debe observarse, que la concentración de ALA empleada para lograr estos efectos es más elevada que la determinada en suero y FCE de pacientes con PAI.

Con respecto a la viabilidad y función neuronal se encontró que el ALA (0,02 mM) rápidamente produce alteraciones en la transmisión del impulso sobre neuronas eléctricamente estimuladas de preparados neuromusculares de langosta, respuesta que se

revirtió lavando la preparación. Es de notar que el PBG, la glicina, el levulinato, el succinato, α y β -aminobutirato no tuvieron acción alguna; estos datos sugieren que el ALA puede ejercer un efecto tóxico reversible sobre las neuronas.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el SNC. En particular, una pérdida de la función normal GABAérgica es la que produce los estados epilépticos. La similitud estructural entre el ALA y el GABA sugiere la posibilidad de que muchas de las manifestaciones del SNC durante una crisis de PAI se deban a la interacción ALA - GABA (Dichter et al., 1977; Muller & Snyder, 1977; Brennan & Cantrill, 1979; Brennan et al., 1980), el ALA cumpliría un rol de agonista parcial del GABA mimetizando o antagonizando los efectos de este neurotransmisor, dependiendo de las condiciones. Así por ejemplo: el ALA (0,01 - 0,05 mM) compete selectivamente por el sitio de unión del GABA a su receptor en sinaptosomas de cerebro de rata, mientras que a concentraciones entre 0,001 y 0,1 mM inhibe la liberación de GABA estimulada por K^+ en sinaptosomas precargados con el neurotransmisor (Muller & Snyder, 1977; Brennan & Cantrill, 1979). El efecto posterior se debe a la acción agonista del ALA sobre los receptores presinápticos de terminales GABAérgicos, cuya estimulación bloquea la liberación de GABA.

Por otro lado, se ha descrito el efecto neurotóxico que ejerce el ALA (0,01 mM) sobre cultivos celulares neuronales y gliales de cerebro de embrión de pollo (Percy et al., 1981). Esta concentración puede hallarse en pacientes con PAI en quienes el nivel de ALA en el FCE es de 21 μ M (Cavanagh & Mellick, 1965).

(5) Deficiencia de hemo en el tejido neural.

El tejido cerebral contiene todas las enzimas del camino biosintético del hemo (Goldberg et al., 1954; Paterniti et al., 1978) si bien las actividades en cerebro de rata son mucho

menores que en hígado (Percy & Shanley, 1980). Podemos entonces plantearnos varias preguntas: a) Ocurre una deficiencia de hemo en el tejido nervioso?, b) Fluctúa el grado de deficiencia con el estado clínico?, c) Los desencadenantes conocidos empeoran el grado de deficiencia del hemo?. En humanos estas preguntas son difíciles de responder y todas las respuestas están basadas en evidencias indirectas.

La deficiencia hepática de hemo no necesariamente se corresponde con una disminución del pool cerebral. Los estudios sobre el ALA-S de este tejido indican que esta enzima no se ve inducida por la acción de las drogas comunes conocidas por inducir la actividad de esta proteína (Paterniti, 1980) y a diferencia de lo que ocurre en el hígado, el manganeso inhibe al ALA-S cerebral no observándose un incremento en la hemooxigenasa. Estos hallazgos sugieren que mecanismo de regulación del camino del hemo en el cerebro sea diferente al que funciona en otros tejidos, según lo han demostrado De Matteis et al. (1981).

Por otro lado, Percy y Shanley (1980) han descripto la presencia de un pool de hemo por estudios con ALA marcado que disminuiría durante la crisis de PAI, con la consecuente reducción de las hemoproteínas; las que están asociadas a la cadena respiratoria (citocromos) producirían un bloqueo funcional de las neuronas con disminución en la utilización de oxígeno por parte del tejido e inhibición del sistema de transporte de electrones, reduciéndose así la generación de energía y la formación de los scavengers naturales (Catalasa y Glutación peroxidasa).

6) Acción del ALA como prooxidante

Esta hipótesis será analizada en el ítem II.3.3. de la introducción.

I.7. Bibliografía

- Anderson P.M. & Desnick, R. (1980) *J. Biol. Chem.*, 255, 1983.
- Araujo, L.S.; Lombardo, M.E.; Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1989) *Comp. Biochem. Physiol.*, 92B, 297.
- Araujo, L.S.; Lombardo, M.E. & Batlle, A. (1994) *Int. J. Biochem.*, 26, 1377.
- Barnes, R.; Jones, M.S.; Jones, O.T.G. & Porra, R.J. (1971) *Biochem. J.*, 124, 633.
- Batlle, A. (1986) *Seminars in Dermatology*, 5, 70.
- Batlle, A.; Magnin, P.H. & Wider, E.A. (1981) en *Porfirinas y Porfirias: Etiopatogenia, Clínica y Tratamiento*; EUDEBA.
- Batlle, A. & Rossetti, M.V. (1977) *Int. J. Biochem*, 8, 251.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.; Gustafson-Potter, K.E.; Matcham, G.W. & McDonald, E. (1979a) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1155.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.; Matcham, G.W. & McDonald, E. (1979b) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 539.
- Battersby, A.R. & Leeper (1990) *Chem. Rev.*, 90, 1261.
- Beaumont, C.; Porcher, C.; Picat, A.C. & Grandchamp, B. (1989) *J. biol. Chem.*, 264, 14829.
- Becker, D.M.; Goldstuck, N. & Kramer, S. (1975) *S. Afr. Med. J.*, 49, 1790.
- Becker, D.M.; Kramer, S.; & Viljoen, J.D. (1974) *J. Neurochem.*, 23, 1019.
- Bird, T.; Hamernyik, P., Nutter, J.Y. & Labbe, R.F. (1979) *Am. J. Hum. Genet.*, 31, 662.
- Bonkowsky, H.L.; Tschudy, D.P. & Collins, A. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 2725.
- Bonkowsky, H.L.; Tschudy, D.P.; Weinbach, E. & Ebert, P.S. (1973) *Clin. Res.*, 21, 961.
- Bornstein, J.C.; Pickett, J.B. & Diamond, I. (1979) *Ann. Neurol.*, 5, 94.
- Brennan, M.J.W.; Cantrill, R.C. & Kramer, S. (1980) *Int. J. Biochem.*, 12, 833.
- Brennan, M.J.W. & Cantrill, R.C. (1979) *Nature*, 280, 514.
- Burton, G.; Fagerness, P.E.; Hosozawa, S.; Jordan, P.M. & Scott, A. (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 202.
- Cardalda, C.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1995) *Eur. J. Biochem.*, En preparación.
- Cavanagh, J.B. & Mellick, R.S. (1965) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 28, 320.
- Cavanagh, J.B. & Ridley, A.R. (1967) *Lancet*, 2, 1023.
- Christenson, W.R.; Reddy, V.R. & Piper, W.N. (1986) *Life Sci.*, 38, 1679.
- Cookson, G.H. & Rimington, C. (1954) *Biochem. J.*, 57, 476.

- Correa García, S.R.; Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1991) *Z. Naturforsch.*, 46c, 1017.
- Correa García, S.R.; Rossetti, M.V.; Bermudez Moretti, M. & Batlle, A. (1995) *Experientia*, Enviado.
- Cutler, M.G.; Moore, M.R. & Dick, J.M. (1980) *Eur. J. Pharmacol.*, 64, 221.
- De Matteis, F.; Zetterlund, P. & Wetterberg, L. (1981) *Biochem. J.*, 196, 811.
- De Matteis, F. & Rimington, C. (1962) *Lancet*, 1, 1332.
- Dichter, H.N.; Taddeini, I.; Lin, S. & Ayala, G.F. (1977) *Brain Res.*, 126, 189.
- Doss, M.; Schneider, J. & Tiepermann, R. (1982) *Clin. Biochem.*, 15, 52.
- Dresel, E. & Falk, J.E. (1953) *Nature*, 172, 1185.
- Elliot, T. (1993) *J. of. Bacteriol*, 175, 325.
- Feldman, D.S.; Levere, R.D. & Lieberman, J.S. (1968) *Trans. Am. Neurol. Assoc.*, 93, 206.
- Feldman, D.S.; Levere, R.D. & Lieberman, J.S. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 68, 383.
- Fischer, H. (1929) *Naturwiss.*, 17, 303.
- Frydman, R.B. & Feinstein, G. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 350, 358.
- Frydman, R.B. & Frydman, B. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.*, 136, 193.
- Frydman, R.B. & Frydman, B. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, 293, 506.
- Fumagalli, S.A., Kotler, M.L. Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1985) *Int. J. Biochem.*, 17, 485.
- Fumagalli, S.A., Kotler, M.L. Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1991) *Z. Naturforsch.*, 46c, 1101.
- Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1969) *Biochem. Med.*, 2, 372.
- Gandour, R.D. (1981) *Bioorg. Chem.*, 10, 169.
- Gibson, J.B. & Goldberg, A. (1956) *J. Path. Bact.*, 71, 495.
- Gibson, S.L.M. & Goldberg, A. (1970) *Clin. Sci.*, 38, 63.
- Goldberg, A. (1959) *Q. J. Med.*, 28, 183.
- Goldberg, A.; Paton, W.D.H. & Thompson, J.W. (1954) *Brit. J. Pharmacol. Ther.*, 9, 91.
- Grandchamp, B.; de Verneuil, H.; Beaumont, C.; Chretien, S.; Walter, O. & Nordmann, Y. (1987) *Eur. J. Biochem.*, 162, 105.
- Granick, S. (1966) *J. biol. Chem.*, 241, 1359.
- Granick, S. & Bogorad, L. (1953) *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 3610.
- Granick, S. & Sassa, S. (1971) en *Metabolic Regulation* [Vogel, H.J. (ed.)]; Academic Press, Orlando; 77.
- Granick, S. & Urata, G. (1963) *J. biol. Chem.*, 238, 821.
- Hart, G.; Abell, C. & Battersby, A. (1986) *Biochem. J.*, 240, 273.

- Hart, G.; Miller, A. & Battersby, A. (1987) *Biochem. J.*, 252, 909.
- Heilmeyer, L. & Clotten, R. (1969) *Klin. Wochenschr.*, 47, 71.
- Higuchi, M. & Bogorad, L. (1975) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 224, 401.
- Irvine, D.G. (1961) *Int. Rev. Neurobiol.*, 16, 145.
- Irvine, D.G.; Dayne, W.; Miyashita, H. & Majer, J.R. (1969) *Nature*, 224, 811.
- Jones, R. & Jordan, P.M. (1994) *Biochem. J.*, 299, 895.
- Jones, C.; Jordan, P.M. & Akhtar, M.A. (1984) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1, 2625.
- Jordan, P.M. (1990) en *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls* [Dailey, H.A. (ed.)]; 55.
- Jordan, P.M. & Sheera, J. (1979) *FEBS Lett.*, 112, 86
- Jordan, P.M. & Shemin, D. (1973) *J. biol. Chem.*, 248, 1019.
- Jordan, P.M. & Warren, M.J. (1987) *FEBS Lett.*, 225, 87.
- Jordan, P.M. & Woodcock, S.C. (1991) *Biochem. J.*, 280, 445.
- Jordan, P.M.; Warren, M.J.; Williams, H.J.; Stolowich, N.J.; Roessner, C.A.; Grant, S.K. & Scott, A.I. (1988) *FEBS Lett.*, 235, 189.
- Jordan, P.M.; Warren, M.J.; Mgbeje, B.I.; Wood, S.P.; Cooper, J.; Louie, G.; Brownlie, P.; Lambert, R. & Blundell, T. (1992) *J. Mol. Biol.*, 224, 269.
- Jordan, P.M.; Burton, G.; Nordlov, H.; Schneider, M.M.; Pryder, L.M. & Scott, A. (1979) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 204.
- Juknat, A.A.; Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1981) *Int. J. Biochem.*, 13, 343.
- Juknat, A.A.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1988a) *Z. Naturforsch.*, 43c, 351.
- Juknat, A.A.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1988b) *Z. Naturforsch.*, 43c, 357.
- Juknat, A.A.; Kotler, M.L.; Koopmann, G.E. & Batlle, A. (1989) *Comp. Biochem. Physiol.*, 92B, 291.
- Juknat, A.A.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1994) *Planta*, 193, 123.
- Kappas, A.; Sassa, S. & Anderson, K.E. (1983) en *The metabolic basis of inherited diseases* [Standbury, J.B.; Wyngaarden, J.B.; Fredrickson, D.S. (eds.)]; McGraw-Hill: New York, 1301.
- Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1987a) *Int. J. Biochem.*, 19, 981.
- Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1987b) *Comp Biochem. Physiol.*, 87B, 601.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1990) *Biotech. & Appl. Biochem.*, 12, 252.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1991) *Biotech. & Appl. Biochem.*, 13, 173.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A.; Correa García, S.R. & Batlle, A. (1988a) *Med. Sci. Res.*, 16, 323.

- Kotler, M.L.; Juknat, A.A.; Correa Garcia, S.R.; Princ, F.G. & Batlle, A. (1988b) *Med. Sci. Res.*, 16, 983.
- Lander, M.; Pilt, A.; Aletounder, P.; Bardy, D.; Abell, C. & Battersby, A. (1991) *Biochem. J.*, 275, 447.
- Lascelles, J. (1964) en *Tetrapyrrole biosynthesis and its regulation*, Benjamin, W.A., New York.
- Llambias, E.B. & Batlle, A. (1970a) *FEBS Lett.*, 6, 285.
- Llambias, E.B. & Batlle, A. (1970b) *FEBS Lett.*, 9, 180.
- Llambias, E.B. & Batlle, A. (1970c) *Biochim. Biophys. Acta*, 220, 552.
- Llambias, E.B. & Batlle, A. (1971a) *Biochem. J.*, 121, 327.
- Llambias, E.B. & Batlle, A. (1971b) *Biochim. Biophys. Acta*, 227, 180.
- Llambias, E. B.; Locascio, G. & Batlle, A. (1971) *Anal. Assoc. Quim. Arg.*, 59, 271.
- Louie, G.; Brownlie, P.; Lambert, R.; Cooper, J.; Blundell, T.; Wood, S.P.; Warren, M.J.; Woodcock, S.C. & Jordan, P.M. (1992) *Nature*, 359, 33.
- Maines, M.D. (1980) *Biochem. J.*, 190, 315.
- Marks, G.S. (1969) en *Heme and Chlorophyll: Chemical, Biochemical and Medical Aspects*, D. Van Nostrans Co, Ltd., London.
- Marver, H.S.; Collins, A.; Tschudy, D.P. & Reichigl, M. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 4323.
- Mazzetti, M.B. & Tomio, J.M. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, 957, 97.
- Mazzetti, M.B. & Tomio, J.M. (1990) *Biochem. Int.*, 21, 463.
- McGillion, T.B.; Thompson, G.G.; Moore, M.R. & Goldberg, A. (1974) *Biochem. Pharmacol.*, 23, 472.
- Meyer, U.S. & Schmid, R. (1973) *Proc. Fedn Amer. Socs. Exp. Biol.*, 32, 1649.
- Meyer, U.A.; Strand, L.S.; Doss, H.; Rees, H. & Marver, H.S. (1972) *New Engl. J. Med.*, 286, 1277.
- Miller, A.; Hart, G.; Packman, L. & Battersby, A. (1988) *Biochem. J.*, 254, 915.
- Moore, M.R.; McColl, K.E.L. & Goldberg, A. (1979) *Diabetes Metab.*, 5, 323.
- Moore, M.R.; McColl, K.E.L. & Goldberg, A. (1980) *Int. J. Biochem.*, 12, 941.
- Moore, M.R.; McColl, K.E.; Rilmington, C. & Sir Goldberg, A. (1987) en *Disorders of Porphyrins Metabolism*, Plenum, New York.
- Muller, W.E. & Snyder, S.H. (1977) *Ann. Neurol.*, 2, 340.
- Murphy, P.C. (1964) *Brit. J. Anaesth.*, 36, 801.
- Nakao, K.; Wada, O.; Kitamura, T.; Uono, K. & Urata, G. (1966) *Nature New Biol.*, 210, 838.
- Neuberger, A. (1980) *Int. J. Biochem.*, 12, 787.

- Neuberger, A. & Scott, J.J. (1953) *Nature*, 172, 1093.
- Nicoll, R.A. (1976) *Life Sci.*, 19, 521.
- Noriega, G.O.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1992) *Z. Naturforsch.*, 47c, 416.
- Paterniti, J.R.; Simone, J.J. & Beattie, D.S. (1978) *Arch. Biochem. Biophys.*, 189, 86.
- Percy, V.A. & Shanley, B.C. (1977) *S. Afr. J. Med.*, 52, 219.
- Percy, V.A. & Shanley, B.C. (1979) *J. Neurochem.*, 33, 126.
- Percy, V.A. & Shanley, B.C. (1980) *Biochem. Pharmacol.*, 29, 1590.
- Percy, V.A.; Lamm, M.C. & Taljaard, J.J. (1981) *J. Neurochem.*, 36, 69.
- Peters, H.A. (1960) en *Metal binding in Medicine* [Johnson, N. (ed.)]; J.B. Lippincott, Philadelphia, XII.
- Peters, H.A.; Cripps, D. & Reese, H.H. (1974) en *Review of Neurobiology* [Pleller, C.C. y Smith, I.R. (eds.)]; Academic Press, New York, XVI, 323.
- Peters, P.G.; Sharma, M.L.; Hardwicke, D.M. & Piper, W. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, 201, 88.
- Petricek, M.; Rutberg, L.; Schroder, I. & Hederstedt, L. (1990) *J. Bacteriol.*, 172, 2250.
- Piper, W.N. & Tephly, T.R. (1974) *Life Sciences*, 14, 873.
- Piper, W.N. & Van Lier, R.B. (1977) *Mol. Pharmacol.*, 13, 1126.
- Ponka, P.; Borova, J. & Neuwert, J. (1974) *Enzyme*, 17, 91.
- Price, J.M.; Brown, R.R. & Peters, H.E.A. (1959) *Neurology*, 9, 456.
- Raich, N.; Romeo, P.H.; Dubart, A. Beaupain, D.; Cohen-Solal, M. & Goosens, M. (1986) *Nucleic Acid Res.*, 14, 5955.
- Rimington, C. (1955) *Endeavour*, 14, 126.
- Rimington, C. (1958) *Rev. Pure and Appl. Chem.* (Royal Australian Chemical Institute), 8, 129.
- Roman, W. (1969) *Am. J. Clin. Nutr.*, 22, 1290.
- Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1977) *Int. J. Biochem.*, 8, 277.
- Rossetti, M.V., Juknat, A.A. & Batlle, A. (1977) *Int. J. Biochem.*, 8, 781.
- Rossetti, M.V.; Juknat, A.A.; Kotler, M.L.; Fumagalli, S. & Batlle, A. (1980) *Int. J. Biochem.*, 12, 761.
- Rossetti, M.V., Lombardo, M.E.L.; Juknat, A.A.; Araujo, L.S. & Batlle, A. (1986) *Int. J. Biochem.*, 85B, 451.
- Rossetti, M.V., Lombardo, M.E.L.; Juknat, A.A.; Araujo, L.S. & Batlle, A. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.*, 2, 451.
- Sachs, P. (1937) *Acta Med. Sca. Suppl.*, 198, 120
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969a) *Biochim. Biophys. Acta*, 191, 130.
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969b) *FEBS Lett.*, 3, 223.

- Sancovich, H.; Ferramola, A.M.; Battle, A.; Kivilevich, A. & Grinstein, M. (1976) *Acta Physiol. Latinoam.*, 26.
- Sassa, S.; Solich, G. & Levere, R.D. (1975) *J. Exp. Med.*, 142, 722.
- Sassa, S.; Zalar, G.L. & Kappas, A. (1978) *J. Clin. Invest.*, 61, 499.
- Sassa, S.; Granick, S.; Bickers, D.R.; Bradlow, H. & Kappas, A. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71, 732.
- Schauder, J.R.; Jendrzejewski, S.; Abell, A.; Hart, G. & Battersby, A. (1987) *J. Chem. Soc. Chem Commun.*, 6, 436.
- Scott, A.; Roessner, C.; Stolorow, N.; Rarauso, P.; Williams, H.; Grant, S.; Gonzalez, M. & Hoshino, T. (1988) *Biochemistry*, 27, 7984.
- Shanley, B.C.; Neethling, A.C.; Percy, V.A. & Carstens, H. (1975) *S. Afr. J. Med.*, 49, 576.
- Shanley, B.C.; Percy, V.A. & Neethling, A.C. (1976) en *Porphyrins in human diseases* [Doss, M. (ed.)]; S. Karger, Basel, .
- Sharif, A.; Smith, A. & Abell, C. (1989) *Eur. J. Biochem.*, 184, 353.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1945) *J. biol. Chem.*, 159, 567.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1946) *J. biol. Chem.*, 166, 621.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1951) *J. biol. Chem.*, 192, 315.
- Shemin, D. & Russel, C.S. (1953) *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 4873.
- Spano, A. & Timko, M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1076, 29.
- Stella, A.M., Parera, V.E., Llambías, E.B. & Battle, A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 252, 481.
- Strand, J.; Felscher, B.F.; Redeker, A.G. & Marver, H. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67, 301.
- Strand, J.; Meyer, V.A. & Felsher, B.F. (1972) *J. Clin. Invest.*, 51, 2530.
- Stubnicer, A.; Picat, A.C. & Grandchamp, B. (1988) *Nucleic Acid Res.*, 16, 3102.
- Sweeney, V.P.; Pathak, M.A. & Asbury, A.K. (1970) *Brain*, 93, 369.
- Ten Eyck, F.W.; Martin, W.J. & Kernohan, J.W. (1961) *Proc. Mayo Clin.*, 36, 409.
- Tephly, T. (1975) en *Porphyrin in Human Diseases* [Doss, M. & Nawrocki, P. (eds.)]; 128.
- Thomas, S.D. & Jordan, P.M. (1986) *Nucleic Acids Res.*, 14, 6215.
- Tschudy, D.P.; Pelroth, M.G.; Marver, H.S.; Collins, A.; Hunter, G.J. & Rechcigl, M. Jr. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 53, 841.
- Warren, M.J. & Jordan, P.M. (1988) *Biochemistry*, 27, 9020.
- Warren, M.J. & Jordan, P.M. (1990) *TIBS*, 15, 486.
- Williams, D.C., Morgan, E.S. & Battersby, A.R. (1981) *Biochem. J.*, 193, 301.
- Woodcock, S.C. & Jordan, P.M. (1994) *Biochemistry*, 32, 2688.

CAPITULO II

RADICALES LIBRES

	Página
II.1. Introducción.....	43
II.2. Química y reactividad en los sistemas biológicos.....	47
II.2.1. Especies reactivas de oxígeno y proteínas.....	54
II.2.2. Especies reactivas de oxígeno y lípidos.....	55
II.2.3. Especies reactivas de oxígeno y ácidos nucleicos.....	57
II.3. Especies reactivas de oxígeno y sus "scavengers".....	58
II.3.1. Anión superóxido y superóxido dismutasa.....	58
II.3.2. Peróxido de hidrógeno y catalasa.....	60
II.3.3. Radical hidroxilo y sus "scavengers".....	61
II.4. Especies reactivas de oxígeno y el camino biosintético de las porfirinas.....	63
II.5. Especies reactivas de oxígeno y sistema nervioso central.....	65
II.6. Bibliografía.....	68

II. RADICALES LIBRES

II.1.Introducción

Los electrones dentro de un átomo o molécula ocupan regiones del espacio conocidas como orbitales. Cada orbital puede mantener dos electrones como máximo, como por ejemplo, los dos electrones que forman la unión covalente y ocupan el mismo orbital molecular pero con spins opuestos. Si un orbital contiene solo un electrón se dice que está desapareado. Se define así como radical libre a aquella especie de existencia independiente capaz de contener uno o más electrones desapareados. Este concepto comprende una gran variedad de especies, resumidas en la Tabla I.II.1.

Tabla I-II.1.: Algunos tipos de radicales libres

Centrado en Hidrógeno	Atomo de Hidrógeno H [·]
Centrado en Carbono	Triclorometil CCl ₃ [·]
Centrado en Azufre	Glutation tiol GS [·]
Centrado en Oxígeno	Superóxido O ₂ ^{-·}
Hidroxilo	OH [·]
Peroxil-lípido	Lípido-O ₂ [·]
Electrones deslocalizados	Fenoxil C ₆ H ₅ O [·]
Oxido Nítrico	NO [·]

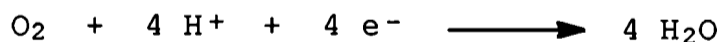
La presencia de un punto (·) como supraíndice indica la presencia de uno o más electrones desapareados.

Aunque los organismos aeróbicos necesitan oxígeno (O₂) para sobrevivir, a concentraciones más altas que las presentes en el aire normal se produce daño celular (Balentine, 1982). Las señales de la toxicidad del oxígeno dependen del organismo en estudio, su edad, estado fisiológico y dieta.

La molécula biatómica del oxígeno califica como un radical porque tiene dos electrones desapareados, cada uno localizado en orbitales diferentes, pero con el mismo número cuántico de spin. La existencia de este spin paralelo es una de las razones por las cuales el O₂ presenta pobre reactividad a pesar de su naturaleza oxidante. Las moléculas orgánicas del cuerpo humano combustionan inmediatamente con el oxígeno del aire, si éste intenta oxidar una molécula directamente aceptando un par de la misma, los dos electrones deben tener spins opuestos a los desapareados en el oxígeno y así se completan los espacios vacantes en los orbitales de este comburente.

Un par de electrones en el mismo orbital podría no seguir este criterio porque ellos tiene spins opuestos para cada uno de los otros. Esta restricción de spin es uno de los factores que retardan la reacción del oxígeno con no radicales (la mayoría de las moléculas biológicas). El O₂ prefiere reaccionar con radicales aceptando los electrones uno a la vez.

Mas del 90% del oxígeno empleado por el ser humano es consumido por la citocromo oxidasa mitocondrial, que adiciona cuatro electrones a cada molécula de oxígeno para generar dos moléculas de agua, según la Reacción I-II.1.:



REACCION I-II.1.

Esta enzima, al igual que otras que emplean oxígeno, contiene metales de transición en su sitio activo, tales como hierro, vanadio, cobre y titanio que tienen estados de oxidación variable; lo cual permite las reacciones de oxido-reducción (Halliwell & Gutteridge, 1989).

La reducción del O_2 a agua por acción de la citocromo oxidasa origina la formación de especies de oxígeno parcialmente reducidas que permanecen firmemente unidas al ión metálico dentro de la enzima no liberándolos a la solución, por lo tanto, no hay radicales de oxígeno reactivos en sus alrededores.

Estas especies incluyen: oxirradicales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$); radicales libres de oxígeno como el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y varias combinaciones; todas agrupadas bajo el término Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) que además incluyen al oxígeno singulete, peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso y su peróxido e hidroperóxido, metabolitos epóxidos de lípidos endógenos y xenobióticos; todos conteniendo oxígeno químicamente reactivo, no son radicales y no necesariamente interactúan con el tejido a través de radicales. También existen otros radicales centrados en nitrógeno, carbono y azufre que pueden generarse en sistemas biológicos y son importantes en la iniciación y/o propagación de varios tipos de afecciones.

Las reacciones donde estas especies intervienen tienen por común denominador la naturaleza libre de los electrones los cuales son capaces de combinarse rápidamente con los de otras biomoléculas para alcanzar un estado más estable con electrones apareados.

Se ha propuesto que los radicales libres serían los responsables de la toxicidad de numerosos compuestos químicos y de la patogénesis de muchas enfermedades. Estas moléculas reactivas pueden producir la mayoría de los cambios tisulares que han sido identificados durante una variedad de procesos nocivos.

Se han desarrollado diferentes marcadores para evaluar el daño mediado por radicales libres (Tabla I.II.2.).

Tabla I-II.2.: Marcadores del daño celular

Indicadores de lipoperoxidación

Malondialdehído
Dienos conjugados
Análisis de ácidos grasos
Emisión de fluorescencia
Grupos carbonilos de proteínas

Actividad de enzimas

Inhibidas por radicales (ej.: Ca^{2+} -ATPasa)
Inducidas por radicales (ej.: Superóxido Dismutasa)

La mayoría de estos marcadores miden cambios tisulares que son consistentes con procesos oxidativos, pero no son siempre específicos para radicales libres, aunque puede lograrse cierta especificidad *in vitro* por medición de los cambios en presencia y ausencia de "scavengers" o secuestradores de estas especies activas tales como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glucosa, sorbitol y dimetilsulfóxido (DMSO).

Los radicales pueden iniciar una serie de eventos bioquímicos dañinos aunque ellos no sean directamente responsables de la disfunción celular final o pueden generarse después de procesos que son la causa próxima del daño celular, no teniendo ningún efecto o aún agravando el daño final; definiéndose éste como alguna alteración que afecta la viabilidad o funcionalidad esencial de la célula, tejido u organismo. Por lo tanto, la sensibilidad del método empleado para evaluar el daño será determinante al momento de estimar el estadio de la afección.

Una vez que el radical libre interactúa con un tejido, se produce un disturbio en el balance prooxidante/antioxidante en favor de la formación de especies oxidantes que afecten el estado

redox de la célula y sean capaces de generar un daño, esto es lo que se define como "stress oxidativo" (Sies, 1985; 1991)

II.2. Química y reactividad en los sistemas biológicos

Técnicamente el dirradical de oxígeno, que tiene dos electrones desapareados en el estado fundamental, u oxígeno triplete es débilmente reactivo debido a la restricción de spin (Kehrer, 1987).

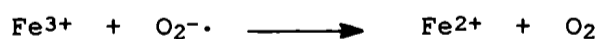
Si se suministra suficiente energía al sistema como para que uno de esos dos electrones desapareados, cambie de orbital desaparece la restricción y se producen dos formas reactivas llamadas oxígeno singulete. Este se forma en sistemas biológicos y tiene la capacidad de interactuar con varias biomoléculas (Sies, 1985), como por ejemplo inhibiendo la Ca-ATPasa (Kukreja *et al.*, 1992).

Esa energía también se puede disipar formando especies, parcialmente reducidas, dando productos con uno, dos y tres electrones, como el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, respectivamente. Estas ROS participan de numerosas reacciones que son esenciales para los organismos aeróbicos, sin embargo su naturaleza reactiva puede producir un daño si no son controladas por el sistema endógeno de antioxidantes.

La abundante presencia del oxígeno en los sistemas biológicos implica que las especies reactivas de oxígeno se encuentren comúnmente. Sin embargo, las moléculas orgánicas contienen otros átomos que pueden existir como radicales libres, y que también pueden tener un rol importante en el daño tisular. Los radicales tioles centrados en el átomo de azufre tales como el glutatión (GS \cdot) producen el clivaje homolítico del puente

disulfuro en las proteínas. Estos radicales son a menudo reactivos y pueden combinarse con el oxígeno para producir radicales adicionales (Jamieson, 1989). Otros radicales encontrados en sistemas biológicos incluyen a los centrados en el carbono, que pueden provenir de la abstracción de un hidrógeno desde una unión no saturada de un ácido graso durante la peroxidación lipídica o del metabolismo de xenobióticos tales como el tetracloruro de carbono. También se ha descrito la existencia de radicales centrados en nitrógeno y fósforo.

La presencia de iones de metales de transición, en particular hierro y cobre, es importante en las reacciones de producción de especies radicales. La capacidad de estos iones para facilitar la transferencia de electrones a macromoléculas biológicas como lípidos, proteínas y ADN, es la base de la formación y propagación de la mayoría de las reacciones tóxicas llevadas a cabo por los radicales, cuyo resultado final es el daño tisular. Por ejemplo, el anión superóxido es relativamente poco reactivo en soluciones acuosas. Sin embargo, en presencia de peróxido de hidrógeno y Fe^{3+} genera el radical hidroxilo, que es extremadamente reactivo. Esta es la conocida reacción de Haber-Weiss catalizada por hierro (Reacción I-II.2.), dentro de la serie de reacciones de Fenton de producción de radicales.



REACCION I-II.2.

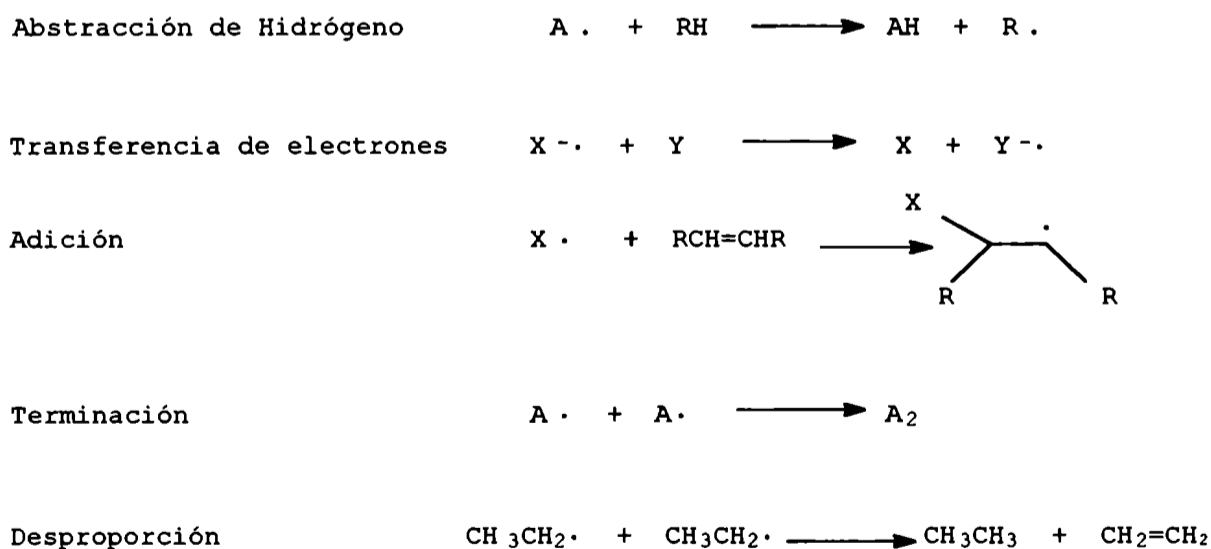
Esta ecuación implica que la toxicidad del $\text{O}_2^{\cdot-}$ y del H_2O_2 in vivo es debida principalmente a su reacción con el hierro y/o cobre para formar $\text{OH}\cdot$ y otras especies oxidantes.

La existencia de metaloproteínas que poseen en su estructura iones de hierro o de cobre indica indirectamente que tales reacciones pueden ocurrir y posteriormente ser perjudiciales para los sistemas biológicos.

Entonces, la naturaleza del daño producido por exceso de formación del H_2O_2 y $O_2^{\cdot -}$ será afectada por la localización del ión metálico que cataliza la reacción I-II.2. dentro de la célula (Cohen & Hochstein, 1963; Muakkassah-Kelly et al., 1982; Halliwell & Gutteridge, 1986; 1989; 1990a; Bielshi, 1991; Cochrane, 1991; Halliwell & Arouma, 1991; Pellman et al., 1991). Por el contrario si no hay iones metálicos disponibles catalíticamente, el efecto dañino será limitado (Cohen & Hochstein, 1963; Halliwell & Gutteridge, 1984; 1986; 1990a; 1990b; Rao et al., 1988).

Hay cinco reacciones básicas características de radicales (Tabla I-II.3.), las que involucran moléculas biológicas incluyendo ADN, proteínas y lípidos y parecen ocurrir constantemente como una consecuencia del ambiente aeróbico en el cual vivimos.

Tabla I-II.3.: Reacciones Básicas



La célula ha desarrollado una batería de defensas para prevenir y reparar el daño asociado con cambios oxidativos en las

macromoléculas antes mencionadas. Estas incluyen dos estrategias: el empleo de quelantes de iones de naturaleza proteica u orgánica como el ácido ascórbico y los uratos o el empleo de sistemas secuestradores de ROS como la SOD, la CAT, el glutatión, la vitamina E y varios otros tales como lipasas que eliminarían los ácidos grasos oxidados, enzimas de reparación de ADN y proteasas para degradar las proteínas dañadas (Figura I-II.1.) (Sies, 1986; Machlin & Bendich, 1987; Halliwell & Gutteridge, 1988; Davies & Wiese, 1990).

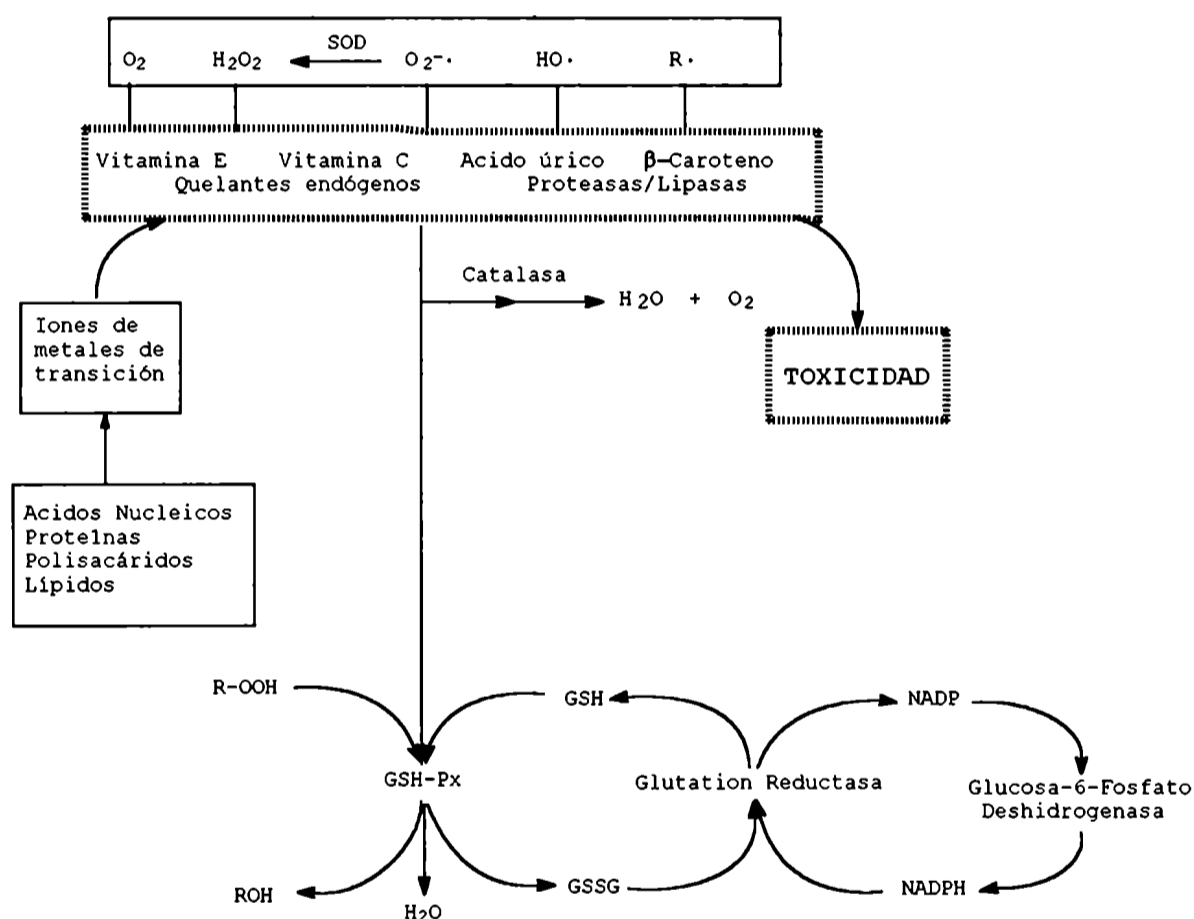


FIGURA I-II.1.: Sistema biológico antioxidante de defensa. Todas las células tienen un espectro de antioxidantes químicos y enzimáticos que trabajan encadenados para minimizar las reacciones oxidativas indeseables dentro de la célula. GSH: Glutación reducido; GSSG: Glutación oxidado.

En el cerebro hay un alto contenido de hierro que si se libera frente a una agresión, no se puede recapturar rápidamente. La liberación de ese hierro podría dañar los ácidos grasos poliinsaturados presentes en dicho tejido. Esto podría explicar la facilidad con la cual ciertas drogas neurotóxicas son capaces de dañar terminales nerviosos, rol que ha sido sugerido para las

ROS en la patogénesis de varias enfermedades neurológicas dado que la deficiencia de vitamina E u otro efecto nocivo basado en radicales libres produce una variedad de síntomas de origen nervioso (Davidson *et al.*, 1988).

El sistema mitocondrial de transporte de electrones ha sido estudiado por su gran capacidad de generación de ROS (Loschen & Flohé, 1971; Boveris *et al.*, 1972; Loschen *et al.*, 1974). Se calcula que hasta el 2% del consumo de oxígeno mitocondrial total se emplea en la producción de especies reactivas de oxígeno (Boveris *et al.*, 1972). Se desconoce la cantidad de radicales producidos por la mitocondria bajo condiciones normales y tóxicas aunque estas organelas son capaces de generar ROS tanto *in vivo* como *in vitro*.

Se han identificado un número de fuentes intracelulares de radicales libres y ROS (Figura I-II.2.), aunque su relación con algún desorden específico es desconocida y el rol que jugaría el daño tisular en las distintas patologías parece variar con las condiciones experimentales específicas empleadas.

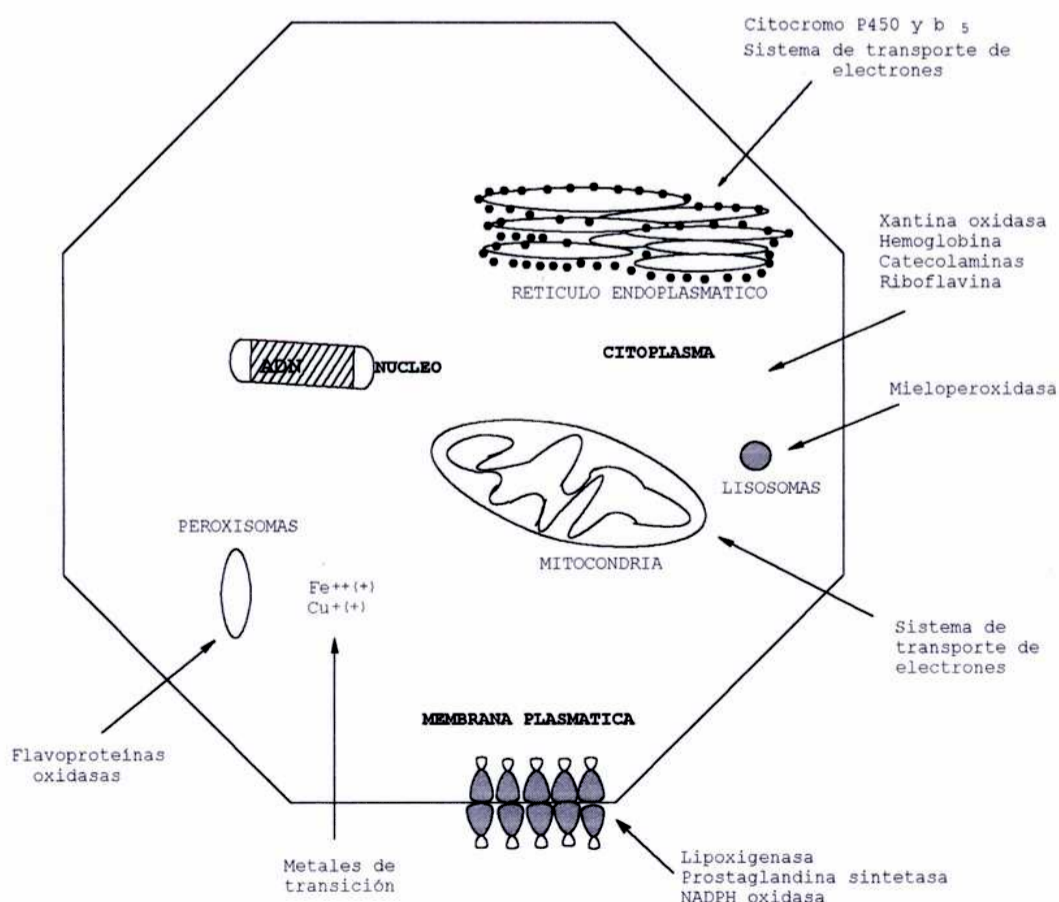


FIGURA I-II.2.: Fuente celular de radicales libres. Son producidos por la actividad de varias enzimas solubles y unidas a membrana.

Los mecanismos por los cuales las ROS actúan como tóxicos celulares se resume en la Figura I-II.3. Todos ellos involucran cambios cuyos efectos acumulativos llevarían a la muerte de la célula.

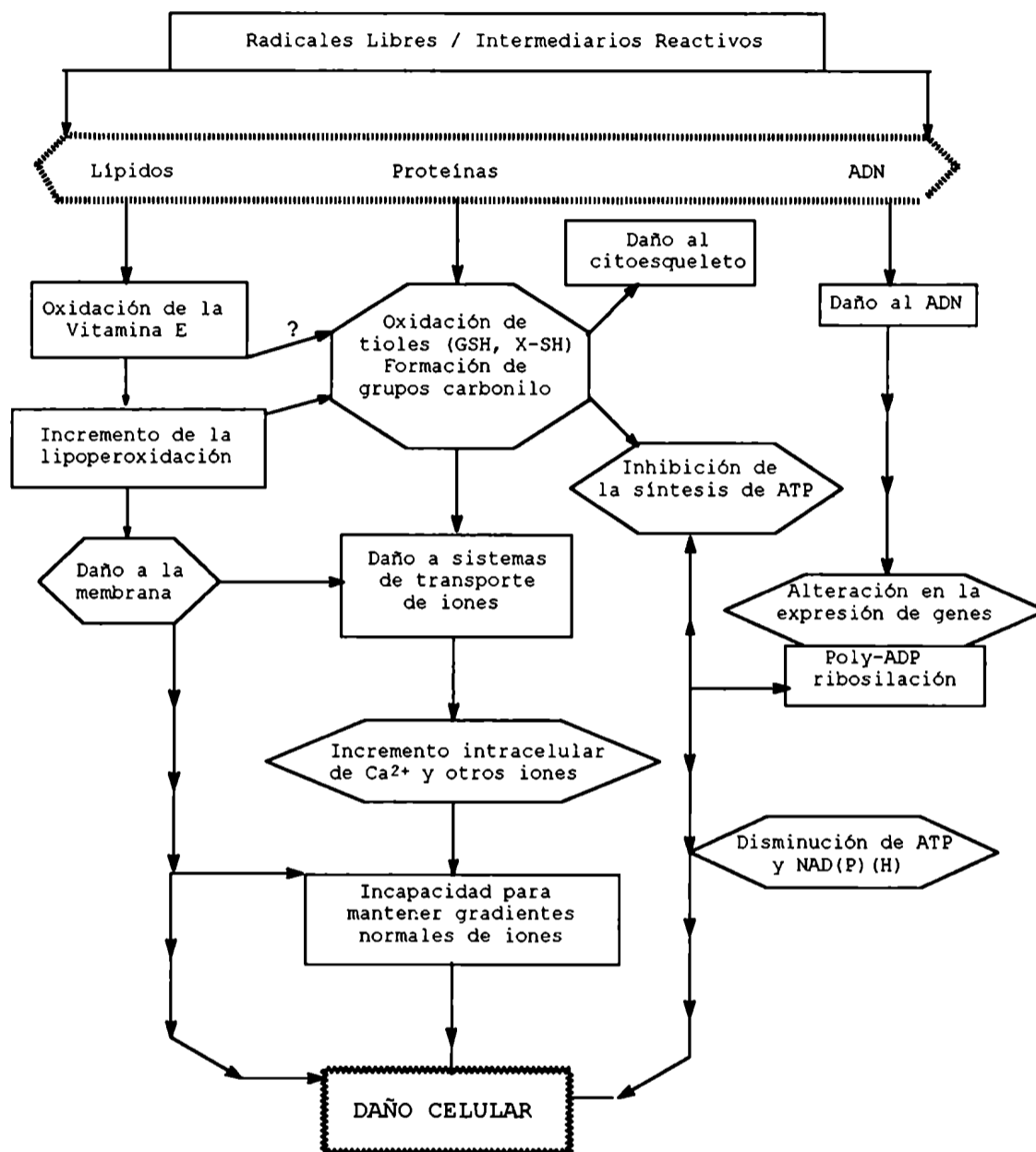


FIGURA I-II.3.: Mecanismos por los cuales los radicales libres dañan las células. La capacidad de estas especies de interactuar con lípidos, proteínas y ADN provee la base de numerosos cambios que podrían afectar la función celular.

Los blancos de acción son los lípidos, por su rol funcional y estructural en la membrana celular, la oxidación de estas moléculas podría afectar la movilidad e integridad de la misma; también las proteínas pueden sufrir la pérdida de sus grupos sulfhidrilos o modificaciones en los aminoácidos formando grupos carbonilos y otros derivados oxidados y en este estado son más susceptibles a la proteólisis (Davies, 1986; 1987).

La interacción de las ROS con el ADN parece afectar la regulación de ciertos genes, lo cual puede resultar en cambios tanto beneficiosos como dañinos para la célula (Cerutti & Trump, 1991; Harris, 1992). Esa interacción puede producir modificaciones directas sobre el ADN o sobre factores de la transcripción o sobre enzimas comprometidas en la regulación de la expresión de genes.

Otro mecanismo involucra una unión covalente irreversible del radical a macromoléculas, que como consecuencia pierden su funcionalidad.

II.2.1. Especies reactivas de oxígeno y proteínas

Las ROS que son generadas dentro de la célula como intermediarias de procesos biológicos normales, tales como las reacciones redox con enzimas comprometidas y las de transferencia bioenergética de electrones, pueden producir daño reversible o irreversible sobre macromoléculas como las proteínas. Estas pueden sufrir degradación (Ballard, 1978; Dean, 1980; Stadtman, 1992) y/o acumularse, cuando la velocidad neta de producción excede a la de su eliminación. Las proteínas oxidadas por si mismas pueden contener especies reactivas, que a su vez pueden dañar otras biomoléculas normales.

Los principales efectos de las ROS son la oxidación, decarboxilación, deaminación de los aminoácidos de las proteínas originando un amplio rango de daños estructurales tales como la escisión de cadenas polipeptídicas y el crosslinking (Carter et al., 1980; Walker et al., 1985; Lees-Miller et al., 1990; Stadtman, 1992). La presencia de grupos sulfhidrilos o residuos aromáticos aumentan la posibilidad de ataque por ROS (Griffith et al., 1992; Laio & Herr, 1992). Como se indicó, la existencia de un ión metálico unido a la superficie de la molécula juega un rol

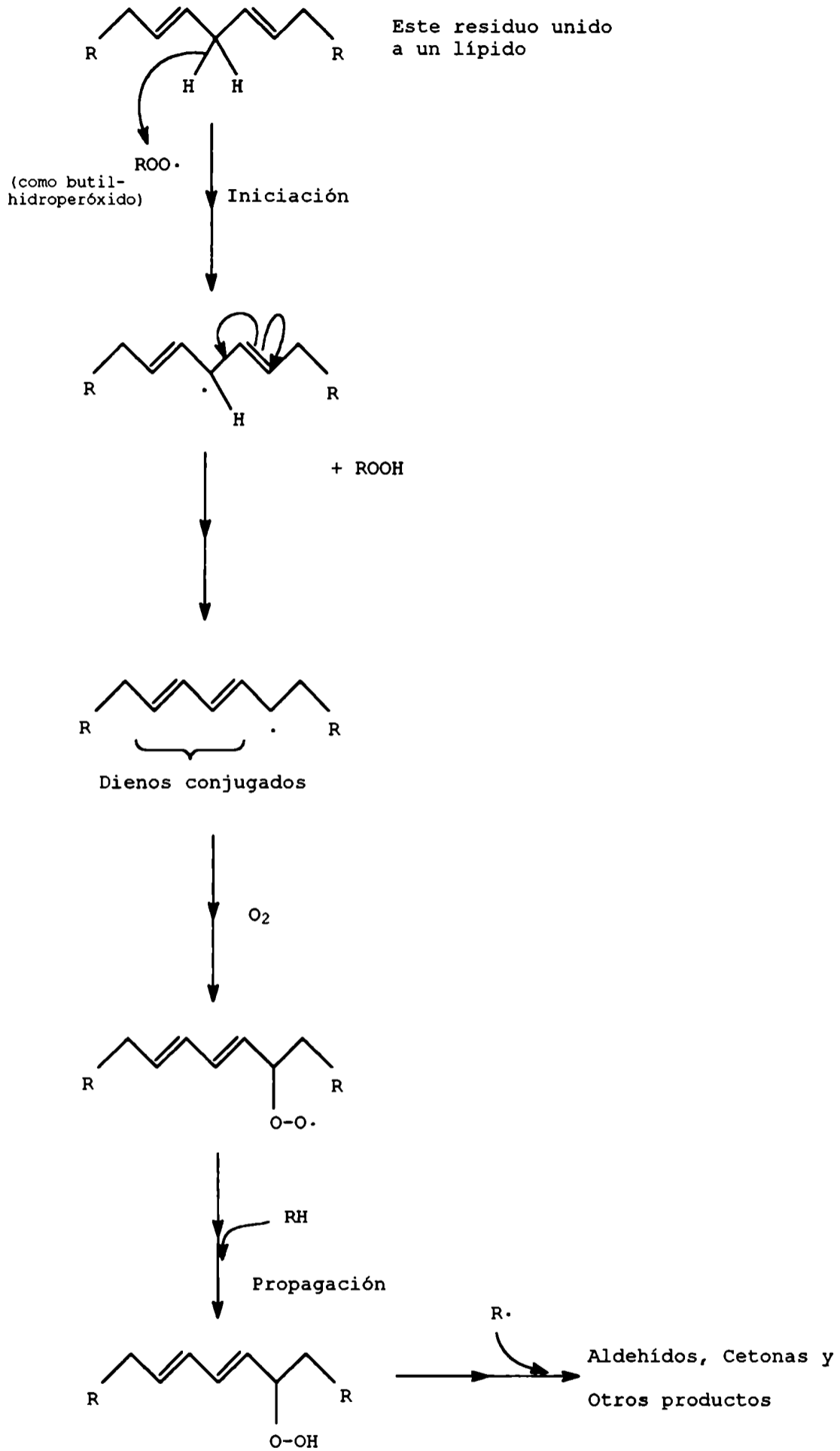
crucial en la iniciación de los cambios químicos y en la sitio-especificidad de la misma.

En el curso de la reacción se generan especies intermedias las que pueden contribuir al stress oxidativo de la célula, consumiendo reactivos reductores o participando en procesos locales sobre la superficie de una proteína, como por ejemplo: consumiendo oxido nítrico, hidroxilando residuos tirosina o triptofano y cadenas laterales de aminoácidos libres o de las proteínas mismas.

II.2.2. Especies reactivas de oxígeno y lípidos

Los radicales como se ha dicho dañan toda clase de moléculas biológicamente activas. El caso de los lípidos, en especial de los ácidos grasos poliinsaturados y sus ésteres, es particularmente bien marcado y juega un papel en muchos procesos fisiopatológicos tales como inflamación, envejecimiento, carcinogénesis, reactividad y toxicidad de drogas y defensa contra protozoos (Sies, 1985).

Cuando el $\text{OH}\cdot$ actúa sobre los lípidos de membrana ocurre un efecto potencialmente devastador. Varias especies reactivas que forman parte de la Reacción I-II.2. son capaces de iniciar el proceso de lipoperoxidación por sustracción de un átomo de hidrógeno desde la cadena lateral de un ácido graso poliinsaturado (lípidos-H) en una membrana lipídica. Las cadenas laterales de estos ácidos grasos (con dos o más dobles ligaduras), tal como al ácido araquidónico, son mucho más sensibles al ataque por radicales libres que los saturados o monosaturados. La sustracción de un hidrógeno deja un radical centrado en carbono en la membrana (lípidos \cdot), según se muestra en la Reacción I-II.3.:



REACCION I-II.3.

El destino más probable de los radicales centrados en carbono *in vivo* es la reacción con el O₂ para formar radicales peroxilo.

Estos radicales atacan proteínas de membrana, dañando así receptores y enzimas, pueden también sustraer átomos de hidrógeno de cadenas laterales de ácido grasos vecinos generando peroxilípidos, cuya existencia dentro de la membrana afecta severamente su funcionalidad, disminuyendo en general la fluidez y permitiendo que iones como el Ca^{2+} se filtren a través de la misma.

Las complejas reacciones de descomposición de los lípidos producen gases hidrocarbonados y un amplio rango de compuestos tóxicos con grupos carbonilo, incluyendo aldehídos. De estos aldehídos, nos interesa el malondialdehído (MDA), por ser indicador de lipoperoxidación. También debe tenerse en cuenta que estos compuestos pueden dañar enzimas unidas a membrana y receptores en células vecinas, por ejemplo: la unión de la serotonina a su receptor en corteza cerebral de rata (Muakkassah-Kelly *et al.*, 1982; Halliwell & Gutteridge, 1984).

La oxidación de lípidos provoca un aumento de intermediarios estables que actúan como precursores en la generación de otros radicales y en otras reacciones. Los lipoperóxidos pueden consumir reductores, tales como el ascorbato o el GSH, o ser fragmentados en radicales reactivos tales como los alcoxiradicales

II.2.3. Especies reactivas de oxígeno y ácidos nucleicos

Uno de los mecanismos para explicar la muerte celular luego de la exposición a las ROS involucra a la enzima poli(ADP-ribosa)-polimerasa, que se activa luego del daño al ADN mediado por peróxidos. Esta enzima utiliza grandes cantidades de NAD para reparar el ADN, disminuyendo así la capacidad de la célula para producir ATP, generando una deficiencia de energía y modificando la concentración intracelular de Ca^{2+} .

Se conoce la existencia de hidroperóxidos de ácidos nucleicos generados por ataque de las ROS al ADN. Por cierto, la acción citotóxica del H_2O_2 sobre casi, si no todas, las células de mamíferos parece involucrar el daño al ADN (Cochrane, 1991). Dependiendo de la célula en estudio, algunos o todos estos efectos lesivos pueden ser mediados por reacción del H_2O_2 con iones hierro y/o cobre, unidos a o encerrados en el ADN, para formar la especie $OH\cdot$ (Halliwell & Aruoma, 1991). Un mecanismo adicional que produce daño en el ADN es el incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} libre, por stress oxidativo, conduciendo a la activación de nucleasas Ca^{2+} dependientes dentro del núcleo.

II.3. Especies reactivas de oxígeno y sus "scavengers"

II.3.1. Anión superóxido y superóxido dismutasa

Si la molécula de oxígeno en estado fundamental acepta un electrón, el producto es el $O_2^{\cdot-}$, el cual contiene, por lo tanto, un electrón desapareado. Se forma en casi todas las células aeróbicas, en una amplia variedad de metabolismos, y en diferentes organelas, por ejemplo: durante el proceso de transporte de electrones en la mitocondria y en retículo endoplasmático (Gillette et al., 1957). Algunos de los electrones pasan a través de esa cadena directamente desde el carrier al O_2 y su formación es proporcional a la concentración de O_2 presente. La toxicidad del exceso de oxígeno puede deberse a la mayor formación de $O_2^{\cdot-}$ sobrepasando la capacidad de las defensas antioxidantes y acelerando la autooxidación de moléculas tales como las catecolaminas.

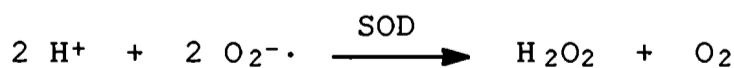
El interior de las membranas biológicas es hidrofóbico y el $O_2^{\cdot-}$ producido en ese ambiente podría ser extremadamente dañino, destruyendo fosfolípidos por ataque nucleofílico sobre grupos

carbonilo de la unión éster de los ácidos grasos al glicerol (Niehaus, 1978). La generación intracelular se realiza en sistemas unidos a membrana (Halliwell, 1981) y en ciertas ocasiones es posible que se haya formado en el interior de la misma.

A nivel celular los generadores de $O_2^{\cdot-}$ incluyen a fagocitos (monocitos, neutrófilos, eosinófilos y varios tipos de macrófagos) y células microgliales del cerebro (Colton & Gilbert, 1987). Hay evidencias que varios tipos de células, tales como fibroblastos, linfocitos y células del endotelio vascular producen y liberan pequeñas cantidades de $O_2^{\cdot-}$ en reacciones fisiológicas (Maly, 1990; Meir et al., 1990; Murell et al., 1990) y que pueden estar comprometidas en la regulación del crecimiento y de señales intracelulares (Halliwell & Gutteridge, 1986).

El superóxido tiene por sí mismo reactividad limitada. Es capaz de inactivar unas pocas enzimas directamente, por ejemplo: la creatinina quinasa (McCord & Russell, 1988) y algunas proteínas hierro-azufradas en bacterias (Gardner & Fridovich, 1991a), así como también es capaz de inactivar *in vitro* a la NADH deshidrogenasa del complejo mitocondrial de la cadena transportadora de electrones (Yang et al., 1990).

La SOD comprende a un grupo de metaloproteínas que tienen una sola función biológica conocida: catalizan la dismutación de dos moléculas de $O_2^{\cdot-}$ en O_2 en estado fundamental y H_2O_2 (McCord & Fridovich, 1969) (Reacción I-II.4.).



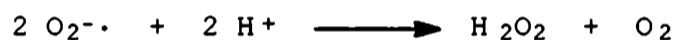
REACCION I-II.4.

Representa la primer línea de defensa contra la toxicidad del oxígeno. Se conocen tres metaloproteínas del tipo SOD en el ser humano: una citosólica Cu/Zn SOD-1, cuya disfunción está involucrada en la esclerosis amiotrófica; una mitocondrial Mn

SOD-2 y una extracelular Cu/Zn SOD-3; existe una forma presente exclusivamente en procariotas, la Fe SOD. La actividad de la SOD en cerebro de rata es baja comparada con la que presenta en otros órganos (Lopez-Torres et al., 1993) por lo tanto no se produciría un efectivo secuestro ante la generación de $O_2^{\cdot-}$ en el tejido nervioso.

II.3.2. Peróxido de hidrógeno y catalasa

La adición de un segundo electrón al anión superóxido origina el ión peróxido (O_2^{2-}), el cual no tiene electrones desapareados y no es un radical. Algunos de los peróxidos formados se protonan, a pH fisiológico, generando el peróxido de hidrógeno. Las SODs catalizan la eliminación de $O_2^{\cdot-}$ por dismutación en oxígeno y peróxido de hidrógeno, según la Reacción I-II.5.:



REACCION I-II.5.

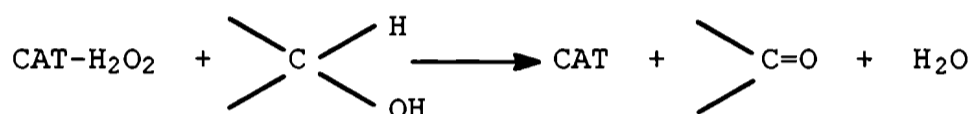
En los tejidos humanos existen varias enzimas que producen peróxido de hidrógeno, tales como L-aminoxidasas, glicolato oxidasa y monoaminoxidasa (MAO). Además la deaminación oxidativa de la dopamina por la MAO es el principal camino catabólico para la dopamina dentro de los terminales dopaminérgicos (Cohen & Hochstein, 1963), donde se debe tener en cuenta que un turnover acelerado de la dopamina provoca un incremento en la formación de H_2O_2 con el consecuente stress oxidativo y destrucción de los terminales nerviosos.

El H_2O_2 puede actuar como un agente oxidante, aunque es poco reactivo. A diferencia de $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 cruza la membrana celular fácilmente y si bien no califica como un radical por no

tener electrones desapareados genera una cascada de efectos semejantes a éstos.

La CAT y la GSH-Px selenio-dependiente son las enzimas encargadas de eliminar el H_2O_2 de las células en humanos, siendo esta última la más importante en cerebro (Cohen & Hochstein, 1963).

La CAT constituye el "scavenger" primario del H_2O_2 y compite con la GSH-Px por el sustrato común; cataliza la captación y posterior descomposición del H_2O_2 (Cohen, 1988), según la Reacción I-II.6.:



REACCION I-II.6.

II.3.3. Radical hidroxilo y sus "scavengers"

El H_2O_2 es conocida por ser tóxica en muchos sistemas, incluyendo el tejido nervioso (Colton et al., 1989; 1991; Bielshi, 1991; Pellman et al., 1991). Sin embargo, la toxicidad no está usualmente mediada por un efecto directo del H_2O_2 excepto a altas concentraciones, posiblemente no fisiológicas, sino que es el precursor de un potente oxidante, el radical hidroxilo ($OH\cdot$), que se forma a través de la reacción con el ión ferroso (Fe_2^+) según la reacción de Fenton (Reacción I-II.7.):



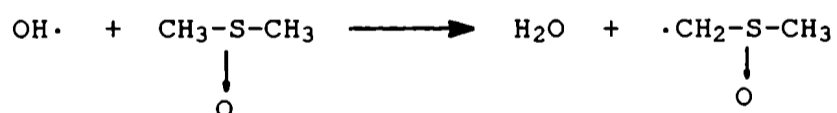
REACCION I-II.7.

Esta reacción procede por una fisión homolítica de la unión O-O del H_2O_2 produciendo el radical hidroxilo. La acción del calor o de la radiación ionizante sobre el peróxido de hidrógeno también genera esta especie.

El radical hidroxilo es probablemente la única especie dañina formada cuando hierro y H_2O_2 están presentes (Halliwell & Gutteridge, 1990a). Los iones de cobre también forman $OH\cdot$ a partir de peróxido de hidrógeno (Cochrane, 1991).

Este radical, una vez generado, reacciona a gran velocidad con casi todas las moléculas que encuentra a su alrededor en una célula viva, incluyendo al ADN, causando la ruptura de las hebras y alteraciones químicas de la deoxirribosa, de las bases purinas y pirimidinas, los lípidos de membrana y los carbohidratos. El $OH\cdot$ nunca atraviesa la membrana mitocondrial o plasmática, antes reacciona con ella.

No existe una enzima que utilice al radical hidroxilo como sustrato específico; sin embargo el manitol, el sorbitol, o la tiourea protegen contra el daño inducido por el sistema generador de $OH\cdot$. Los "scavengers" naturales como la vitamina E y el β -caroteno reducen la formación de $OH\cdot$ en un 92% y 50% respectivamente, mientras que otros de origen orgánico como el DMSO (150 mM) lo hacen en un 94%, medidos en ambos casos como efecto sobre la quimioluminiscencia del luminol, (Rao et al., 1988). El mecanismo de reacción en soluciones acuosas de DMSO se conoce bien y ocurre según la Reacción I-II.8.:



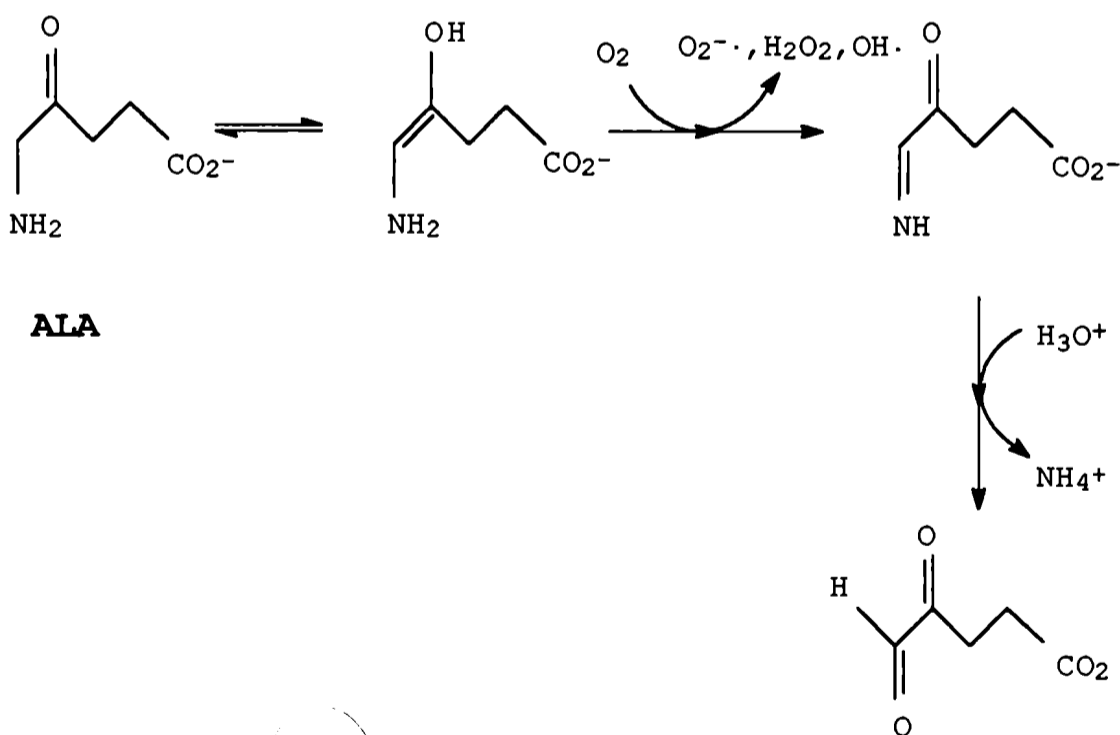
REACCION I-II.8.

II.4. Especies reactivas de oxígeno y camino biosintético de las porfirinas

Como se ha descrito, una de las hipótesis para explicar las manifestaciones clínicas de la Porfiria aguda intermitente (PAI) compromete a los precursores ácido δ -aminolevúlico (ALA) y Porfobilinógeno (PBG). Particularmente el ALA es capaz de cruzar

la barrera hematoencefálica y distribuirse en el sistema nervioso central y otros órganos (McGillion et al., 1974; 1975). Las bases bioquímicas no pueden aclarar la toxicidad por acumulación de ALA. A nivel neuroquímico el ALA inhibe la unión del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico a su receptor y la bomba Na^+/K^+ ATPasa, aunque no pueden explicarse los cambios neuropatológicos como la degeneración axonal y la desmielinización. Una propuesta es que el ALA pueda por autooxidación, a pH fisiológico, generar especies reactivas de oxígeno (Hermes-Lima et al., 1991) que desencadenarían los procesos, relacionando la acumulación de ALA en la PAI con el stress oxidativo.

Existen evidencias que la forma enólica del ALA genera ROS por autooxidación (Reacción I-II.9.). Por otro lado, los niveles eritrocitarios de SOD y GSH-Px están aumentados en pacientes con PAI (Medeiros et al., 1982), lo que justifica la presencia de ROS.



ALA

REACCION I-II.9.

La existencia de dobles ligaduras conjugadas en la estructura de las porfirinas hace que éstas sean buenasceptoras

de electrones y en presencia de oxígeno durante períodos de luz generen efectos citotóxicos (Sconfienza et al., 1980). La presencia de sistemas generadores de ROS conducen a la oxidación *in vitro* de los porfirinógenos incrementándose esta velocidad con iones de metales de transición presentes en la mezcla de reacción.

El producto final de este camino es el grupo hemo el que se asocia a distintas proteínas para formar hemoproteínas (hemoglobina, mioglobina, peroxidasas, citocromo P₄₅₀, otros citocromos). La hemoglobina se transporta en eritrocitos, que son ricos en CAT, SOD y GSH-Px. Sin embargo, la hemoglobina y la mioglobina aisladas son degradadas por exposición a un exceso de H₂O₂, con la liberación de hierro capaz de catalizar reacciones generadoras de radicales libres (Gutteridge, 1986; Puppo & Halliwell, 1988). Además la hemoglobina reacciona con el H₂O₂ para formar especies oxidantes unidas a proteínas capaces de estimular la lipoperoxidación (Kanner et al., 1987). A nivel cerebral, el espasmo de las arterias, puede ser la consecuencia de una complicación tardía de un ataque hemorrágico, proceso en el que estarían comprometidas la liberación de la hemoglobina desde los eritrocitos en el coágulo y la subsecuente reacción de radicales libres (Steele et al., 1991).

Los oxidantes pueden liberar iones hierro del hemo, hemoproteínas y hierro-proteínas no hémicas (Gutteridge, 1986; Gutteridge & Smith, 1988; Balla et al., 1991), contribuyendo a los procesos lesivos *in vivo*.

II.5. Especies reactivas de oxígeno y sistema nervioso central

El daño en el sistema nervioso central (SNC) es uno de los mayores problemas clínicos. Las lesiones traumáticas o isquémicas del cerebro o de la médula espinal son a menudo el resultado de

un daño más extensivo del tejido nervioso, en estos procesos están involucradas las reacciones de radicales libres (Demopoulos et al., 1982; Halliwell & Gutteridge, 1985; Traystman et al., 1991). La isquemia aparece como primer respuesta del tejido a la reoxigenación, con un aumento en las velocidades de generación de $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 .

El cerebro y el sistema nervioso son especialmente propensos al ataque de radicales por diversas razones (Halliwell & Gutteridge, 1985; LeBel & Bondy, 1991). Primero, los lípidos de membrana son muy ricos en ácidos grasos poliinsaturados con cadenas laterales, que como hemos visto son particularmente sensibles al ataque por radicales provocando la ruptura de la membrana y un rápido incremento de ácidos grasos libres en el cerebro; esto puede proveer sustratos para el ataque de las ROS y para la síntesis en exceso de prostaglandinas y leucotrinas en la reoxigenación. Segundo, el cerebro es pobre en actividad de CAT y contiene moderada cantidad de SOD y GSH-Px, lo que haría a este sistema más indefenso frente al ataque por ROS. Tercero, varias áreas del cerebro humano son ricas en hierro (Youdim, 1988a,b), además el líquido cerebro espinal no tiene suficiente capacidad para unir hierro porque su contenido en transferrina (proteína transportadora de hierro) es muy bajo, lo cual implicaría que durante un proceso lesivo, dejaría al hierro libre para catalizar la reconversión de radicales.

Cómo podría ocurrir entonces el daño celular?. La lipoperoxidación sería una posibilidad, aunque no es la única. Entre otras hipótesis se encuentra el ataque al ADN y a proteínas con la consecuente disminución de ATP e incremento intracelular de Ca^{2+} , y posterior activación de proteasas dependientes de Ca^{2+} . Es interesante resaltar el efecto de ROS sobre la glutamina sintetasa que incrementa los niveles de uno de los aminoácidos excitatorios: el glutamato, al disminuir su eliminación.

Tanto el $\text{OH}\cdot$ como el $\text{NO}\cdot$ generado en las células nerviosas pueden afectar un número de receptores de moléculas tróficas, tales como el factor trófico derivado del cerebro y neurotrofinas que actúan sobre motoneuronas.

Las ROS están implicadas en distintas disfunciones nerviosas, como resultado de una serie de alteraciones: el turnover de la dopamina en las neuronas, está modificado; los niveles de glutatión reducido y total están disminuidos en el SNC lo cual conduce a una disminución en la protección contra la formación del $\text{OH}\cdot$; la concentración de hierro está aumentada por lo tanto hay mayor probabilidad de una interacción con el H_2O_2 con la consecuente formación de $\text{OH}\cdot$ y aumento de la lipoperoxidación. Esto sugiere que el stress oxidativo está presente en los desórdenes neurológicos y es crucial en la neurodegeneración. En estas reacciones los radicales libres serían los conductores de estos fenómenos o aparecerían como consecuencia de la degeneración celular debida a diferentes procesos etiológicos.

Desde una perspectiva clínica, la relevancia de la hipótesis de los radicales libres es la que provee una base para considerar las estrategias antioxidantes, que podrían ser neuroprotectoras e interferir con la natural progresión de las enfermedades. Tales estrategias incluyen: (1) acceso a métodos tendientes a inhibir o disminuir la formación de radicales; (2) empleo de "scavengers" que reaccionen directamente con el radical para proteger a las moléculas biológicas e inhibir las reacciones en cadena que perpetúan a los radicales y (3) utilizar quelantes de hierro para mantener al metal en una forma no reactiva.

II.6. BIBLIOGRAFIA

- Balentine, J.D. (1982) en *Pathology of Oxygen Toxicity*. Academic Press, New York.
- Balla, G.; Vercelloti, G.M.; Muller-Eberhard, U.; Eaton, J. & Jacob, H.S. (1991) *Lab. Invest.*, 64, 648.
- Ballard, F.J. (1978) *Essays Biochem.*, 13, 1.
- Bielshi, B.H.J. (1991) *Free Radic. Res. Commun.*, 12, 469.
- Boveris, A.; Oshino, N. & Chance, B. (1972) *Biochem. J.*, 128, 617.
- Carter, T. & col. (1980) *Mol. Cell Biol.*, 10, 6460.
- Cerutti, P.A. & Trump, B.F. (1991) *Cancer Cells*, 3, 1.
- Cochrane, C. (1991) *Mol. Aspects Med.*, 12, 137.
- Cohen, G. (1988) en *Oxygen Radicals and Tissue Injury* [Halliwell, B. (ed.)], FASEB; Bethesda, Maryland, 130.
- Cohen, G. & Hochstein, P. (1963) *Biochemistry*, 2, 1420.
- Colton, C.A.; Fagni, L. & Gilbert, D.L. (1989) *Free Radic. Biol. Med.*, 7, 3.
- Colton, C.A. & Gilbert, D.L. (1987) *FEBS Lett.*, 223, 284.
- Colton, C.A.; Yao, J.; Grossman, Y. & Gilbert, D.L. (1991) *Free Radic. Res. Commun.*, 14, 385.
- Davidson, A.; Tibbits, G.; Shi, Z. & Moon, J. (1988) *Mol. Cell. Biochem.*, 84, 199.
- Davies, M.J. & Wiese, J.G. (1990) en *Molecular Biology of Aging* [Finch, C.E. & Johnson T.E. (eds.)]; Wiley-Liss, New York, 123.
- Davies, K.J.A. (1986) *J. Free Rad. Biol. Med.*, 2, 155.
- Davies, K.J.A. (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 9895.
- Dean, R.T. (1980) *Fed. Proceed.*, 38, 15.
- Demopoulos, H.B.; Flamm, E.; Selligman, M. & Pietronigro, D.D. (1982) en *Pathology of Oxygen* [Autor, A.P. (ed.)]; Academic Press, New York, 127.
- Gardner, P.R. & Fridovich, I. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 1478.
- Gillette, J.R.; Brodie, B.E. & La Du, B.N. (1957) *J. Pharmacol. Exp. Theor.*, 119, 532.
- Griffith, A.J. & col. (1992) *Mol. Cell Biol. Rep.*, 16, 91.
- Gutteridge, J.M.C. (1986) *FEBS Lett.*, 201, 291.
- Gutteridge, J.M.C. & Smith, A. (1988) *Biochem. J.*, 256, 861.
- Halliwell, B. (1981) en *Age Pigments* [Sohal, R.S. (ed.)]; Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1.
- Halliwell, B. & Aruoma, O.I. (1991) *FEBS Lett.*, 281, 9.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1984) *Biochem. J.*, 219, 1.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1985) *TINS*, 8, 22.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, 246, 501
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1988) *Hum. Toxicol.*, 7, 7.

- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1989) en *Free radicals in Biology and Medicine*; Clarendon Press; Oxford, 142.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1990a) *Method Enzymol*, 186, 1.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1990b) *Arch. Biochem. Biophys.*, 280, 1.
- Harris, E.D. (1992) *FASEB J.*, 6, 2675.
- Hermes-Lima, M.; Valle, V.G.R.; Vercesi, A.E. & Bechara, E.J.H. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1056, 57.
- Jamieson, D. (1989) *Free Rad. Biol. Med.* 7, 87.
- Kanner, J.; German, J.B. & Kinsella, J.E. (1987) *CRC Crit Rev Food Sci. Nutr.*, 25, 317.
- Kehrer, J.P. (1987) en *Handbook on the toxicity of inorganic compounds* [Siegel H. & Sieler H. (eds.)]; Marcel Dekker, New York, 505.
- Kukreja, R.C.; Jesse, R.L. & Hess, M.L. (1992) *Mol. Cell. Biochem* 111, 17.
- Laio, J.S. & Herr, W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6958.
- LeBel, C.P. & Bondy, S.C. (1991) *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 341.
- Lees-Miller, S. P.; Chen, Y.R. & Anderson, C.W. (1990) *Mol. Cell Biol.*, 10, 6472.
- Lopez-Torres, M.; Perez-Campo, R.; Cadenas, S.; Rojas, C. & Barja, G. (1993) *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B, 757.
- Loschen, G.; Azzi, A.; Richter, C. & Flohé, L. (1988) *FEBS Lett.* 42, 68.
- Loschen, G. & Flohé, L. (1974) *FEBS Lett.*, 18, 261.
- Machlin, L.J. & Bendich, A. (1987) *FASEB J.*, 1, 441.
- Maly, F.E. (1990) *Free Radicals Res. Commun*, 8, 143.
- McCord, J.M. & Russell, W.J. (1988) en *OxyRadicals in Molecular Biology and Pathology* [Cerutti, P.A.; Fridovich, I.; McCord, J.M. (eds.)]; Alan R. Liss Inc, New York, 27.
- McCord, J.M. & Fridovich, I. (1969) *J. biol. Chem.*, 244, 6049.
- McGillion, F.B.; Thomson, G.G.; Moore, M.R. & Goldberg, A. (1974) *Biochem. Pharmacol.*, 23, 472.
- McGillion, F.B., Thomson, G.G. & Goldberg, A. (1975) *Biochem Pharmacol.*, 24, 299.
- Medeiros, M.H.G., Marchiori, P.E. & Bechara, E.J.H. (1982) *Clin. Chem.*, 28, 242.
- Meir, B.; Radeke, H.; Selle, S.; Raspe, H.H.; Sies, H.; Resch, K. & Habermehl, G.G. (1990) *Free Radicals Res. Commun*, 8, 149.
- Muakkassah-Kelly, S.F.; Andersen, J.W.; Shih, J.C. & Hochstein, P. (1982) *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 104, 1003.
- Murell, G.A.C.; Francis, M.J.O. & Bromley, L. (1990) *Biochem J.*, 265, 659.
- Niehaus, W.G. (1978) *Bioorg. Chem.*, 7, 77.

- Pellman, T.C.; Hollinden, G.E. & Sarvey, J.M. (1991) *Neuroscience*, 44, 353.
- Puppo, A. & Halliwell, B. (1988) *Biochem. J.*, 249, 185.
- Rao, P.S.; Lubber, J.M.; Milinowicz, J.; Lalezari, P. & Mueller, H.S. (1988) Academic Press, New York, 291, 39.
- Sconfienza, C., Van Der Vorst, A. & Jori, G. (1980) *Photochem. Photobiol.*, 31, 351.
- Sies, H. (1986) *Angew Chem* 25, 1058.
- Sies, H. (1985) en *Oxidative Stress: Introductory remarks in oxidative stress* [Sies, H. (ed.)]; Academic Press, New York; I.
- Sies, H. (1991) en *Oxidative Stress: Introduction in oxidative stress. Oxidants and antioxidants* [Sies, H. (ed.)]; Academic Press, San Diego, XV.
- Stadtman, E.R. (1992) *Science*, 257, 1220.
- Steele, J.A.; Stockbridge, N.; Maljkovic, G. & Weir, B. (1991) *Circ. Res.*, 68, 416.
- Traystman, R.J., Kirsch, R. & Koehler, R.C. (1991) *J. Appl. Physiol.*, 71, 1185.
- Walker, A.I.; Hunt, T.; Jackson, R.J. & Anderson, C.W. (1985) *EMBO J.*, 4, 139.
- Yang, Y.; Marcellat, O.; Giulivi, C.; Ernster, L. & Davies, K.J.A. (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 16330.
- Youdim, M.B.H. (1988a) en *Brain iron. Neurochemical and Behavioural Aspects*; Taylor & Francis, New York and Philadelphia.
- Youdim, M.B.H. (1988b) *Mt. Sinai J. Med.*, 55, 97.

MATERIALES

Y METODOS

CAPITULO I

MATERIALES

	Página
I.1. Animales.....	71
I.2. Reactivos.....	71
I.3. "Scavengers".....	72
I.4. Geles.....	72
I.5. Equipos.....	72

I. MATERIALES

I.1. Animales

Se emplearon ratas macho CHbb THOM de 200 - 300 g de peso, alimentadas con dieta normal para animales de laboratorio (Purina 3) y agua *ad libitum*. Las mismas fueron mantenidas bajo un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 h (luz desde las 6:00 hasta las 18:00h).

Los animales previamente heparinizados se sacrificaron por punción cardíaca entre las 10:00 y 11:00 h, bajo anestesia con eter etílico. Se extrajo inmediatamente el cerebro y posteriormente se procedió a la disección de la corteza cerebral y del cerebelo.

I.2. Reactivos

El ácido δ -aminolevúlico (ALA) fue adquirido en Sigma Chemical Co., EE.UU. y el medio mínimo esencial (MEM) fue obtenido de Gibco Lab., EE.UU.

El porfobilinógeno (PBG) se sintetizó enzimáticamente según la metodología descrita por Sancovich et al. (1970), a partir de ALA y empleando ALA-D de hígado bovino.

Los patrones de porfirinas procedían de Porphyrin Products, EE.UU.

El ácido fólico y la sulfamerazina (SMZ) provenían de Sigma Chemical Co., EE.UU.

La [4,5- ^3H] L-Leucina [1,000 mCi] fue adquirida de Dupont Products, EE.UU.

Todos los demás reactivos provenientes de diversas fuentes comerciales fueron de grado analítico.

I.3. "Scavengers"

Las enzimas superóxido dismutasa (SOD, E.C. 1.15.1.1) y catalasa (CAT, E.C. 1.11.1.6) purificadas de eritrocitos e hígado bovino, respectivamente, fueron adquiridas en Sigma Chemicals Co., EE.UU. El Dimetilsulfóxido (DMSO) provenía de Merck AG-Darmstadt, Alemania.

I.4. Geles

Los geles de Sephadex G-25 (grueso), y Sephacryl S-200 se adquirieron en Pharmacia Fine Chemicals, Suecia.

Las dimensiones de las columnas fueron las siguientes:

- Sephadex G-25 grueso: volumen de cama = 45 ml; diámetro = 2,5 cm; longitud = 60 cm.
- Sephacryl S-200: volumen de cama = 200 ml; diámetro = 2,5 cm; longitud = 50 cm.

I.5. Equipos

Los homogenatos se prepararon usando un Potter Elvehjeem con un émbolo de teflón y pistón de vidrio.

Las centrifugaciones se realizaron empleando las centrífugas refrigeradas Sorvall RC-5B de Dupont Co. o Centricon H-401 de Kontron Hermle, la ultracentrífuga Sorvall OTD65B y las centrifugas de mesa Rolco CM-36.

Para las determinaciones espectrofotométricas se emplearon espectrofotómetros Shimadzu modelo UV-210 o Hewlett Packard modelo HP8452A. Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofluorómetro Shimadzu modelo RF-510.

Tanto en la calibración de la columna de Sephacryl como durante el proceso de purificación de las enzimas a través de la misma, se utilizó un colector de fracciones modelo FRAC-300 de Pharmacia Fine Chemicals.

Las condiciones de esterilidad durante la preparación del particulado se lograron y mantuvieron utilizando luz UV y un flujo laminar (Labconco Purifier, class II safety cabinet).

El tratamiento por sonicación del particulado se realizó con un sonicador Heat Systems Ultrasonics W-185D.

La cromatografía para la determinación de las porfirinas libres y del tipo isomérico de las mismas se realizó por cromatografía líquida de alta presión en un equipo Shimadzu. El mismo consta de un sistema de bombas LC-10AS, un inyector manual reodyne 7125, un detector espectrofluorométrico RF-10A, un controlador del sistema SCL-10A y un integrador CHROMATOPAC CR-7A.

La determinación de radioactividad se realizó en un contador de centelleo líquido marca Tracor Analytic, modelo 6892.

CAPITULO II

METODOS

	Página
II.1. Preparación de los tejidos.....	76
II.1.1. Obtención de la fracción homogenato.....	76
II.1.2. Obtención del particulado de cerebelo.....	76
II.2. Metodología de incubación.....	76
II.2.1. Sistema de incubación de la enzima PBG-D.....	76
II.2.2. Sistema de incubación de las enzimas ALA-D y PBG-D en presencia de secuestrantes.....	77
II.2.3. Siembra del particulado de cerebelo.....	77
II.2.4. Sistema de incubación del particulado de cerebelo.....	78
II.3. Determinaciones.....	79
II.3.1. Viabilidad celular.....	79
II.3.2. Porfirinas por espectrofotometría.....	80
II.3.3. ALA.....	80
II.3.4. PBG.....	81
II.3.5. Porfirinas por espectrofluorometría.....	81
II.3.6. Glucosa.....	81
II.3.7. Malondialdehído.....	82
II.3.8. Dienos conjugados.....	83
II.3.9. Porfirinas por HPLC.....	83
II.3.10. Tipo isomérico de porfirinas por HPLC.....	84
II.3.11. Contenido proteico.....	86
II.3.11.1. Método de Lowry.....	86
II.3.11.2. Método de Warburg y Christian.....	87
II.3.12. Peso molecular.....	87
II.4. Tratamiento de datos.....	88
II.4.1. Unidad enzimática.....	88
II.4.2. Análisis de datos.....	88

II. METODOS

II.1. Preparación de tejidos

II.1.1. Obtención de la fracción homogenato

La corteza cerebral y el cerebelo se homogeneizaron en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 8,0 en una relación 1:10 (m/v).

II.1.2. Obtención del particulado de cerebelo

El particulado de cerebelo se preparó según la técnica descripta por Alperin et al. (1986).

El cerebelo embebido en medio MEM se cortó rápidamente en pequeños trozos (0,5-1 mm) con ayuda de una hoja de bisturí. El tejido disgregado se transfirió de inmediato a un tubo cónico de 30 ml (Falcon Plastics Inc.) que contenía el mismo medio. El material así obtenido fue aspirado y expelido con rapidez empleando una pipeta Pasteur del 1 mm de diámetro. Este procedimiento se repitió diez veces cambiando el medio para separar de esta manera el particulado del material en suspensión.

Se dejó sedimentar el particulado durante 30 seg y se descartó el sobrenadante.

II.2. Metodología de incubación

II.2.1. Sistema de incubación de la enzima PBG-D

El sistema standard de incubación contenía 2 ml de fracción enzimática, PBG [30 µg en 0,1 ml] y buffer fosfato de sodio 50 mM pH 8 hasta completar un volumen final de 3 ml.

Todas las incubaciones se realizaron a 37°C, en aerobiosis durante 2 h, en oscuridad y con agitación continua.

En todos los casos se efectuaron los blancos de actividad enzimática correspondientes, los cuales contenían PBG o fracción enzimática y buffer.

Finalizada la incubación, la reacción se detuvo precipitando la proteína por agregado de un volumen adecuado de TCA 10% para alcanzar una concentración final del 5%.

Posteriormente, los tubos se iluminaron con luz natural durante 20 min y se separó el precipitado por centrifugación. En el sobrenadante se midieron espectrofotométricamente las porfirinas formadas.

II.2.2. Sistema de incubación de las enzimas ALA-D y PBG-D en presencia de secuestrantes

El sistema contenía 2 ml de homogenato de cerebelo, obtenido según se describió en II.1.1, ALA [835 µg en 0,1 ml] o PBG [30 µg en 0,1 ml], SOD 50 U/ml o CAT 4,5 µM o DMSO 150 mM y buffer fosfato de sodio 50 mM hasta completar un volumen final de 3 ml.

En el caso de las incubaciones de ALA-D se empleó un buffer de pH 6,8 mientras que para la determinación de la actividad de PBG-D en mismo fue de pH 8.

Se realizaron los blancos correspondientes para ambos casos, empleándose el sistema de incubación sin el agregado del sustrato.

Se prosiguió según la metodología detallada en el ítem II.2.1.

II.2.3. Siembra del particulado de cerebelo

Se siembra un volumen del particulado, obtenido como ya se describió en el ítem II.1.2., con una pipeta Pasteur (Figura

M-II.1.), distribuyendo regularmente las partículas sobre el fondo de cada cavidad (Figura M-II.2.).



FIGURA M-II.1.: Siembra del particulado de cerebelo de rata en la cavidad.



FIGURA M-II.2.: Vista del fondo de la cavidad con el particulado de cerebelo de rata sembrado

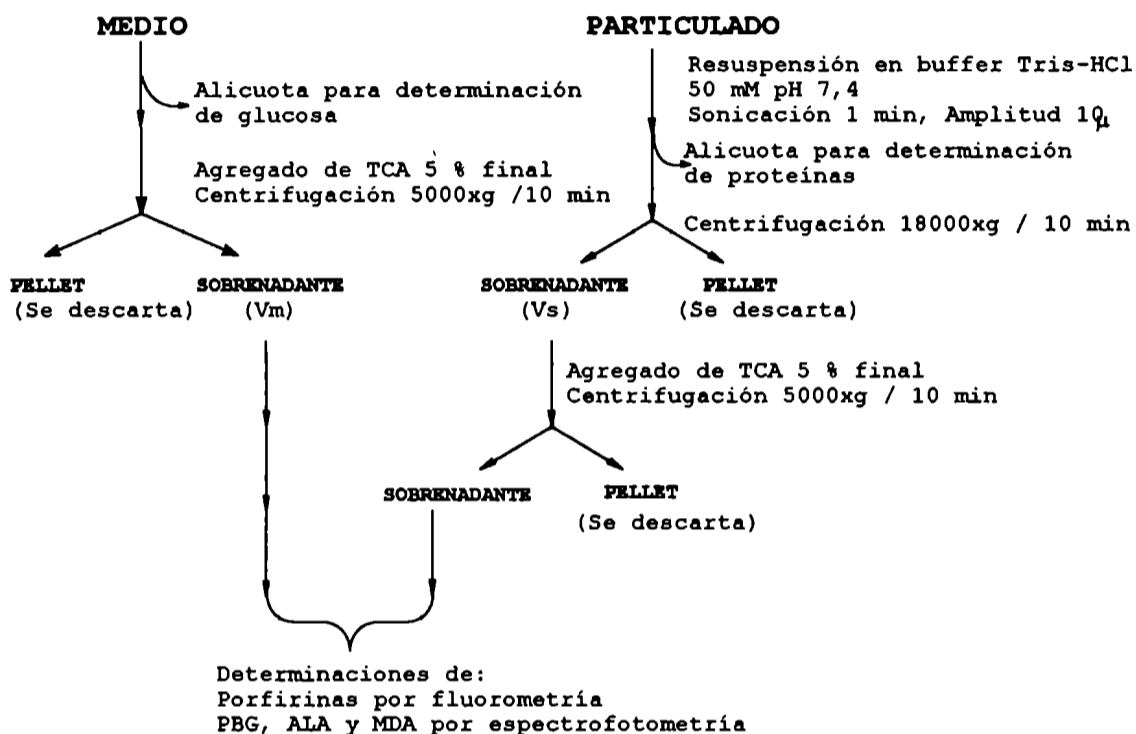
II.2.4. Sistema de incubación del particulado de cerebelo

El sistema de incubación standard contenía ALA como sustrato en diferentes concentraciones según se indica en resultados, el particulado y 2 ml de medio compuesto de MEM conteniendo glucosa (1 g/l), suplementado con 2,2 g/l de NaHCO_3 y L-glutamina a una concentración final de 2 mM (Alperin et al., 1986).

Las incubaciones fueron realizadas en wells de 16 mm de diámetro (Corning, New York) colocados en un incubador (Heraeus) con una atmósfera de 5% de CO_2 /95% de humedad relativa, a 37°C

durante distintos tiempos como se indica en resultados. Cada 15 min se agitó la placa para homogeneizar el sistema.

Finalizada la incubación se agregó 2,5 ml de buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 frío y mediante centrifugación se separó el particulado del medio. Se continuó con la siguiente metodología:



II.3. Determinaciones

II.3.1. Viabilidad celular

Se incubó el particulado con medio conteniendo [4,5-³H] L-leucina (5 µCi/cavidad) durante diferentes tiempos según se indica en resultados. Una vez finalizada la incubación se procedió a separar las fases empleando una centrífuga Eppendorf, se centrifugó a 12000 rpm durante 30 seg y se lavó el particulado con medio frío recolectándose los sobrenadantes.

Finalizados los lavados se agregó buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 al particulado y se lo sonicó durante 1 min con una amplitud de 10µ. Posteriormente, se llevó a una concentración final de TCA 5%, para precipitar el material proteico.

Se midió la marca incorporada a la proteína del particulado y la remanente en el medio de incubación.

II.3.2. Porfirinas por espectrofotometría.

Las porfirinas formadas durante la incubación de la enzima PBG-D se cuantificaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 380 nm, 430 nm y en el máximo de la banda de Soret ($A_{\text{máx}}$). Se calculó la cantidad total de porfirinas aplicando la expresión de Rimington (1960):

$$\text{nmoles porfirinas totales} = (2 \cdot A_{\text{máx}} - (A_{430} + A_{380})) \cdot f \cdot V_f$$

A : absorbancia a las longitudes de onda indicadas en los subíndices
 V_f : volumen final
 f : 1,008

II.3.3. ALA

La cuantificación de ALA se realizó por el método de Mauzerall y Granick (1956) según la modificación de Moore y Labbe (1964). A una alícuota del sobrenadante de V_s y de V_m se le agregó buffer acético-acetato 1 M pH 4,6 y acetilacetona. Se calentó en baño de agua a 80°C durante 10 min para obtener el ALA-pirrol. Paralelamente se efectuó un blanco de reactivos. Luego de enfriar, se agregó igual volumen de reactivo de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehído 2% (p/v), 75 ml de ácido acético glacial y 25 ml de ácido clorhídrico (c)), se dejó reaccionar durante 8 min y se leyó la absorbancia a 555 nm. La cantidad de ALA se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{nmoles ALA} = \frac{(A_{555} - A_{\text{bco}}) \cdot 1000 \cdot V_c \cdot F_{\text{dil}}}{f}$$

A_{555} : absorbancia a 555 nm
 A_{bco} : absorbancia a 555 nm del blanco de reactivos
 V_c : volumen de condensación
 F_{dil} : factor de dilución
 f : 58

II.3.4. PBG

La cantidad de PBG se determinó espectrofotométricamente empleando el reactivo de Ehrlich según la técnica descrita por Mauzerall y Granick (1956). A una alícuota de V_s se le agregó igual volumen del reactivo y a los 8 min se leyó la absorbancia a 555 nm. El contenido de PBG se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{nmoles PBG} = \frac{A_{555} \cdot V_f \cdot F_{dil}}{\epsilon \cdot PM} \cdot 10^{-6}$$

A_{555} : absorbancia de la solución a 555 nm
 F_{dil} : factor de dilución
 V_f : volumen final
 ϵ : 113,6 (absorbancia de una solución de PBG de concentración 1 mg/ml)
 PM : 226

II.3.5. Porfirinas por espectrofluorometría

Las porfirinas obtenidas durante la incubación del particulado fueron determinadas espectrofluorométricamente en solución ácida. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 400 y 594 nm respectivamente, con un ancho de banda espectral de 10 nm. Se empleó una solución de Coproporfirina I en 0,1 M de HCl como standard para realizar la curva de calibración. Las porfirinas se calcularon empleando la siguiente ecuación:.

$$\text{pmoles porfirinas / ml muestra} = \%F_m \cdot K$$

$\%F_m$: porcentaje de fluorescencia de la muestra
 K : cociente entre la concentración del patrón y el porcentaje de fluorescencia del patrón

II.3.6. Glucosa

El contenido de glucosa en el medio se determinó colorimétricamente por el método de la glucosa oxidasa (Trinder, 1969).

A una alícuota de 0,2 ml de V_m se le agregó 2 ml del reactivo de trabajo, compuesto por reactivo 4-AF (solución de 4-aminofenazona 25 mM en buffer Tris 0,92 M), reactivo fenol (solución de fenol 55 mM), reactivo con enzimas (Glucosa oxidasa 1000 U/ml y Peroxidasa 120 U/ml) y agua c.s.p., en relación 50:50:3:1000 (v:v:v:v). Se incubó durante 10 min a 37°C y se leyó la absorbancia a 505 nm. Como standard se empleó una solución de glucosa de 1 g/l y se calculó el contenido en las muestras, según la siguiente expresión:

$$\text{glucosa (g / l)} = \frac{A_m}{A_s}$$

A_m : absorbancia de la muestra a 505 nm

A_s : absorbancia del standard a 505 nm

II.3.7. Malondialdehído

El malondialdehído (MDA) se determinó según el método descrito por Niehaus y Samuelson (1968). A 1 ml de V_s o V_m se le agregaron 2 ml de un reactivo compuesto por ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,375% p/v, HCl 0,25 N y ácido tricloroacético (TCA) 15% p/v. La solución se calentó durante 15 min en baño de agua en ebullición. Luego de enfriar, se centrifugó a 2000xg durante 10 min para separar el precipitado y se determinó la absorbancia de la muestra a 535 nm. La concentración de MDA se calcula empleando la siguiente fórmula:

$$\text{moles MDA} = \frac{(A_{535} - A_{bco}) \cdot V_m}{\epsilon}$$

A_{535} : absorbancia de la muestra a 535 nm

A_{bco} : absorbancia del blanco de reactivos a 535 nm

V_m : volumen de la muestra

ϵ : $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

II.3.8. Dienos conjugados

La cantidad de dienos conjugados se determinó por el método descrito por Recknagel & Ghoshal (1966). A 1 ml de Vs se le agregaron 5 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (2:1) (v:v), se agitó fuertemente y se centrifugó a 2000xg durante 5 min, para separar las fases. La capa superior se removió por succión y a 3 ml de la fase inferior se la llevó a sequedad en baño de agua a 45°C. El residuo lipídico se disolvió en 1,5 ml de ciclohexano y se midió la absorbancia a 233 nm contra un blanco de ciclohexano.

La cantidad de hidroperóxidos producidos puede calcularse usando la siguiente expresión:

$$\text{moles dienos} = \frac{A_{233} \cdot V_m}{\epsilon}$$

A_{233} : absorbancia de la muestra a 233 nm
 V_m : volumen de la muestra
 ϵ : $2,52 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

II.3.9. Porfirinas por HPLC

La determinación cromatográfica de las porfirinas libres se realizó según la técnica de Seubert y Seubert (1989).

Las condiciones empleadas fueron las siguientes:

Columna: RP-18, longitud = 125 mm

diámetro interno = 4 mm

diámetro de partículas = 7 μm .

Solvente A: Solución de fosfato diácido de potasio y ácido fosfórico.

Solvente B: metanol.

Flujo: 1,5 ml/min.

Volumen de muestra: 20 μl

Temperatura de corrida: 30°C

Se empleó un gradiente lineal entre 62% y 100% con metanol en 5 min manteniendo el 100% por otros 5 min más. La detección de

las porfirinas eluidas se realizó espectrofluorométricamente empleando longitudes de onda de excitación y emisión de 405 nm y 630 nm respectivamente.

Las muestras se filtraron previamente empleando filtros Whatman de 0,2 μm de poro.

Una determinación con patrones de porfirinas de concentración conocida muestra el siguiente cromatograma (Figura M-II.3.):

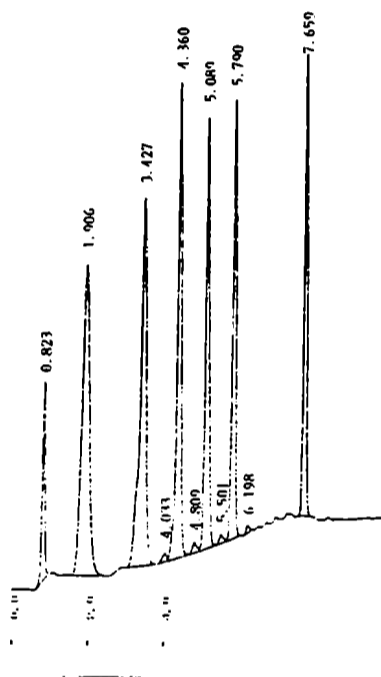


FIGURA M-II.3.: Cromatograma de las porfirinas separadas por HPLC.

Los tiempos de retención para las porfirinas se resumen en la Tabla M-I.1.

TABLA M-I.1.: Tiempos de retención para las porfirinas

Tipo de Porfirina	Tiempo de retención (min)
Uroporfirina	1,9
Heptaporfirina	3,4
Hexaporfirina	4,3
Pentaporfirina	5,1
Coproporfirina	5,8
Protoporfirina	7,7

II.3.10. Tipo isomérico de porfirinas por HPLC

La determinación cromatográfica del tipo isomérico de las porfirinas se realizó según la técnica de Lim et al. (1983).

Las condiciones empleadas fueron las siguientes:

Columna: RP-18, longitud = 125 mm

diámetro interno = 4 mm

diámetro de partículas = 7 μm .

Solvente A: Buffer acetato de amonio 1 M pH 5,16

Solvente B: acetonitrilo.

Flujo: 1,0 ml/min.

Volumen de muestra: 20 μl

Temperatura de corrida: 30°C

Se empleó un gradiente lineal entre 10% y 30% con acetonitrilo en 15 min manteniendo el 30% por otros 10 min más. La detección de las porfirinas eluidas se realizó por espectrofotometría empleando una longitud de onda de 404 nm.

Las muestras se filtraron previamente empleando filtros Whatman de 0,2 μm de poro.

Una determinación con patrones de concentración conocida muestra el siguiente cromatograma (Figura M-II.4.):

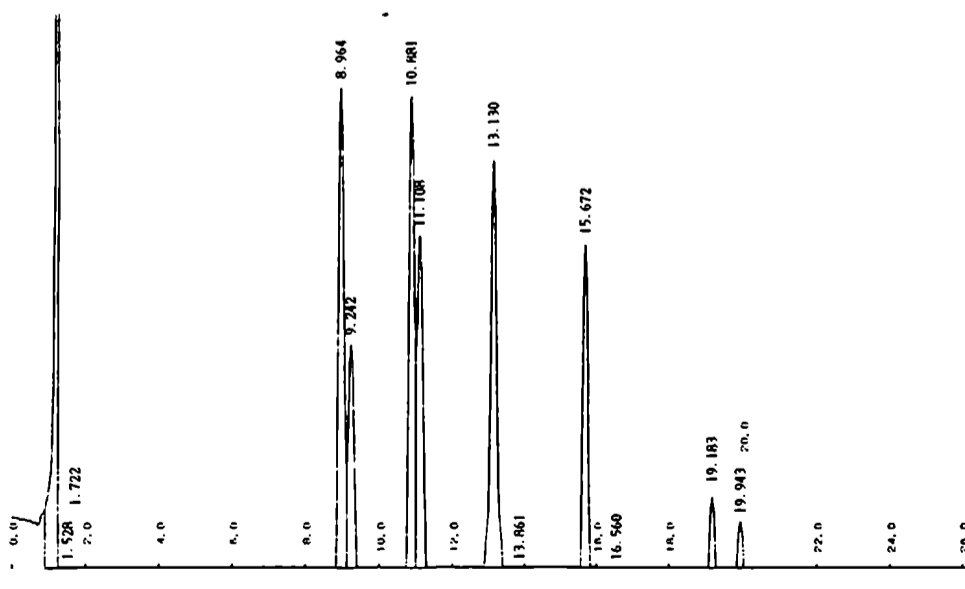


FIGURA M-II.4.: Cromatograma del tipo isomérico.

Los tiempos de retención de los distintos isómeros se detallan en la Tabla M-I.2.

TABLA M-I.2.: Tiempos de retención de los isómeros

Tipo de Porfirina	Tipo isomérico	Tiempo de retención (min)
Uroporfirina	I	8,9
	III	9,2
Heptaporfirina	I	10,9
	III	11,1
Hexaporfirina	I	13,1
	III	13,8
Pentaporfirina	I	15,6
	III	16,5
Coproporfirina	I	19,2
	III	19,9

II.3.11. Contenido proteico

II.3.11.1. Método de Lowry

El contenido proteico de las preparaciones enzimáticas y del particulado se determinó empleando el reactivo Folin-Ciocalteu (Lowry et al., 1951). A 0,4 ml de la dilución apropiada de la proteína, en agua o en NaOH 0,6 M para proteínas solubles o insolubles respectivamente, se les agregó 2,5 ml de una mezcla alcalina compuesta de Na₂CO₃ 2%, CuSO₄ y tartrato de sodio y potasio en relación 100:1:1 (v:v:v), a la que luego de 10 min. se le adicionó 0,2 ml del reactivo Folin-Ciocalteu. Se midió la absorbancia a 660 nm luego de transcurridos 30 min. Se utilizó seroalbúmina bovina como standard.

Paralelamente se realizó el blanco de reactivos que contenía la mezcla alcalina, el reactivo de Folin-Ciocalteu y agua.

La cantidad de proteína se calculó aplicando la siguiente expresión:

$$\text{proteína [mg / ml]} = (A_{660} - A_{bco}) \cdot f \cdot F_{dil}$$

A_{660} : absorbancia de la muestra a 660 nm
 A_{bco} : absorbancia del blanco de reactivos a 660 nm
 f : factor obtenido de la curva de calibración
 F_{dil} : factor de dilución

II.3.11.2. Método de Warburg y Christian

Las proteínas presentes en los eluidos de las diferentes columnas se cuantificaron directamente empleando el método de Warburg y Christian (1941).

El contenido proteico se calculó usando la siguiente expresión:

$$\text{proteína [mg / ml]} = (1,45 \cdot A_{280} - 0,74 \cdot A_{260}) \cdot F_{dil}$$

A_{260} y A_{280} : absorbancias a 260 y 280 nm respectivamente
 F_{dil} : factor de dilución

II.3.12. Peso molecular

El armado de las columnas así como el tratamiento previo de los geles se realizó según la técnica descrita por Batlle (1968). Se empleó un gel acrilato (Sephacryl), calculándose el PM según la metodología de Andrews (1964, 1965).

En el caso de las proteínas globulares, los cálculos están afectados por un error aproximado del 10%.

La calibración de la columna se realizó empleando proteínas de PM conocido, graficándose en escala semilogarítmica: PM en

función de V_e/V_o (siendo V_e y V_o los volúmenes de elución y muerto respectivamente) ($r= 0,973$) (Figura M-II.5.).

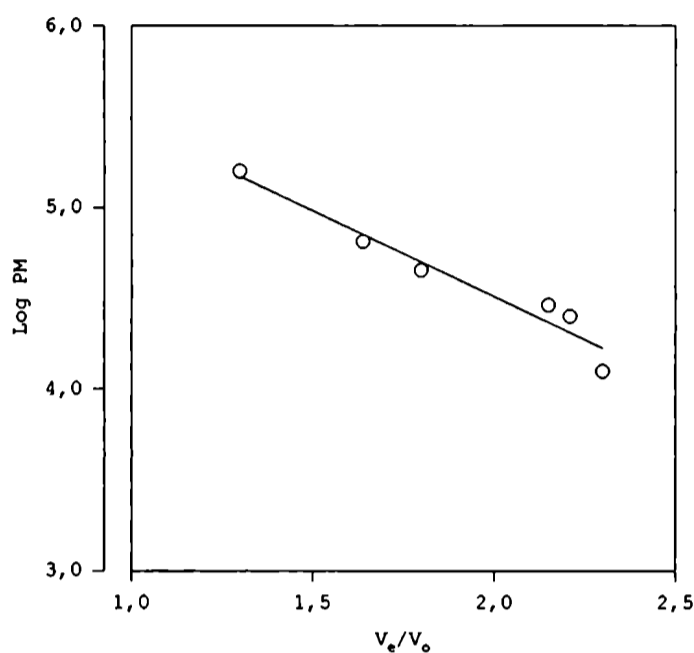


FIGURA M-II.5.: Curva de calibración de la columna de Sephacryl S-200 con proteínas de peso molecular conocido: γ -globulina (160000), Albúmina bovina (65000), Ovoalbúmina (45000), Anhidrasa carbónica (29000), Ribonucleasa (25000) y Citocromo C (12500).

II.4. Tratamiento de datos

II.4.1. Unidad enzimática

Se define una unidad enzimática (U.E.) como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de producto en las condiciones standard de incubación.

La actividad específica (A.E.) se define como el número de unidades enzimáticas por mg de proteína.

II.4.2. Análisis de datos

Los datos presentados corresponden a promedios \pm S.D. calculados a partir de 4 experimentos independientes realizados cada uno por duplicado. Para cada experimento se empleó el

particulado de cerebello obtenido de 15 a 20 ratas. En el caso de los ensayos enzimáticos se utilizó la corteza cerebral y el cerebello de 20 a 25 animales.

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos se efectuó empleando el test de Student y el ajuste a una recta se determinó mediante el coeficiente de regresión (r).

II.5. Bibliografía

- Alperin, D.M., Idoyaga-Vargas, V.P. y Carminatti, H. (1986) *J. Neurochem.*, 47, 355.
- Andrews, P. (1964) *Biochem. J.*, 91, 222.
- Andrews, P. (1965) *Biochem. J.*, 96, 595.
- Batlle, A. (1968) *Ciencia e Investigación*, 24, 242.
- Lim, C.K.; Rideout, J.M. & Wright, D.J. (1983) *Biochem. J.*, 211, 435.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. biol. Chem.*, 193, 265.
- Mauzerall, D. y Granick, S. (1956) *J. biol. Chem.*, 219, 435.
- Moore, D. y Labbe, R. (1964) *Clin. Chem.*, 10, 1105.
- Niehaus, W.G. & Samuelson, B. (1968) *Eur. J. Biochem.*, 6, 126.
- Recknagel, R.O. & Ghoshal, A.K. (1966) *Exp. Mol. Pathol.*, 5, 413.
- Rimington, C. (1960) *Biochem. J.*, 75, 620.
- Sancovich, H.; Ferramola, A.; Batlle, A. y Grinstein, M. (1970) en *Methods in Enzymology* [Tabor y Tabor (eds.)]; Academic Press, New York; XVII, 220.
- Seubert, S. & Seubert, A. (1989) *Merck Spectrum*, 2, 8.
- Trinder, P. (1969) *Ann. Clin. Biochem.*, 6, 24.
- Warburg, O. y Christian, W. (1941) *Biochem. Z.*, 310, 384.

RESULTADOS
Y DISCUSION

CAPITULO I

PORFOBILINOGENO-DEAMINASA DE CORTEZA CEREBRAL y CEREBELO DE RATA. AISLAMIENTO y PROPIEDADES.

	Página
I.1. Introducción.....	92
I.2. Aislamiento de la PBG-D.....	93
I.2.1. Aspectos generales.....	93
I.2.2. Determinación de las condiciones óptimas para la extracción de la enzima	
Selección del buffer y del pH de extracción.....	94
I.2.3. Obtención de la PBG-D. Efecto de la temperatura y del tiempo de	
calentamiento sobre el tipo isomérico y las porfirinas formadas.....	98
I.3. Purificación parcial de la PBG-D.....	102
I.4. Propiedades.....	107
I.4.1. Efecto de la cantidad de proteína.....	107
I.4.2. Efecto del tiempo de incubación.....	108
I.4.3. Efecto de la concentración de sustrato.....	110
I.4.4. Estudios cinéticos.....	111
I.4.5. Estabilidad frente al estacionamiento.....	112
I.4.6. Determinación del peso molecular.....	114
I.5. Efecto del ácido fólico y de la sulfamerazina.....	114
I.6. Bibliografía.....	120

I. PORFOBILINOGENO-DEAMINASA DE CORTEZA CEREBRAL y CEREBELO DE RATA. AISLAMIENTO y PROPIEDADES.

I.1. Introducción

Como ya se señaló, en el ítem I.6.2., la PAI se caracteriza por un amplio espectro de manifestaciones gastrointestinales, neurológicas y psiquiátricas. Los pacientes presentan dolores abdominales difusos, de tipo cólico, que no ceden ni con analgésicos ni con opiáceos, acompañados de vómitos y estreñimiento severo. Respecto al sistema nervioso se han descrito manifestaciones correspondientes a daño hipotalámico. Se observa un elevado pasaje de hormona antidiurética a la circulación, lo que produce oliguria sin edema, retención de agua, hiponatremia con vómitos y convulsiones por intoxicación con agua.

Paralelamente existen fenómenos motores con parálisis o paresias de extremidades y de músculos respiratorios, laríngeos y deglutorios, algias musculares, hipotonía, hiporreflexia e impotencia funcional, pudiendo llegar a la insuficiencia respiratoria. Dentro de los síntomas mentales son frecuentes los estados de excitación, depresión, ansiedad, confusión, insomnio, alucinaciones y disturbios emocionales (Batlle y Magnin, 1988).

Las anormalidades neurológicas asociadas a la PAI sugieren una participación de los sistemas nerviosos central, autónomo y periférico. En cuanto al sistema nervioso central es interesante resaltar las funciones en las que están involucrados la corteza cerebral y el cerebelo. La primera dirige los movimientos musculares esqueléticos, recibe la información sensorial e integra la actividad sensitiva y motora. También procesa la memoria, inicia y coordina el aprendizaje y todas las funciones cognitivas superiores y controla los fenómenos de expresión de sentimientos y emociones.

Con respecto al cerebelo, una manera de apreciar el papel que el mismo desempeña en la función normal del organismo es a través del estudio de aquellos signos que se asocian con su disfunción. Entre los más importantes se encuentran la debilidad muscular (astenia), la disminución del tono muscular (hipotonía), los movimientos oscilatorios de los ojos (nistagmo), el temblor muscular al efectuar movimientos voluntarios (temblor intencional) y la pérdida general de la coordinación muscular (ataxia).

A pesar de todos los estudios efectuados hasta el momento, las alteraciones patofisiológicas que se observan en la neuropatía porfírica aún no están aclaradas. Como ya se mencionó en el ítem I.6.2., el bloqueo parcial de la síntesis de porfirinas en esta patología se halla a nivel de la enzima PBG-D, que se encuentra inhibida en un 50% en hígado y eritrocitos de pacientes con PAI.

Si bien la información que existe sobre esta enzima es abundante, no hay datos en sistema nervioso. Por este motivo resultó de sumo interés estudiar la biosíntesis de porfirinas y en particular la actividad de la PBG-D en corteza cerebral y cerebelo de rata.

I.2. Aislamiento de la PBG-D

I.2.1. Aspectos generales

En primer lugar se realizaron una serie de experiencias tendientes a determinar las condiciones óptimas para extraer y medir la actividad de la PBG-D de corteza cerebral y cerebelo de rata. En estos ensayos la actividad enzimática se expresa en base a los nmoles de producto formado ya sean porfirinas o uroporfirina del tipo isomérico I, después de la etapa de calentamiento.

Los datos que se presentan corresponden o bien a valores obtenidos en experiencias típicas o bien a promedios de ensayos repetidos. Cada valor proviene de duplicados o triplicados.

Salvo se indique lo contrario, todas las operaciones se realizaron a 4°C.

I.2.2. Determinación de las condiciones óptimas para la extracción de la enzima. Selección del buffer y del pH de extracción

Se seleccionó el buffer y el pH más conveniente para la extracción de la PBG-D de corteza cerebral y de cerebelo de rata. Para ello se utilizaron soluciones de buffer fosfato de sodio y Tris-HCl, ambos 50 mM.

La corteza cerebral y el cerebelo recién extraídos se lavaron con solución fisiológica (NaCl 0,9%) y luego se homogeneizaron en los buffers antes citados, a pH 7,4 en una relación 1:10 (g tejido fresco : ml buffer). La fracción **homogenato** (H), así obtenida, se centrifugó a 4500xg durante 20 min y se separaron las fracciones **sobrenadante** (S) y **pellet** (P).

En la Tabla R-I.1. se ilustran los datos obtenidos empleándose la fracción S como fuente enzimática.

TABLA R-I.1.: Efecto del buffer de extracción

Fuente enzimática	Buffer de extracción	Proteína (mg / ml)	Porfirinas formadas	
			Actividad (nmoles)	A.E. (nmoles / mg)
Corteza Cerebral	Tris-HCl	5,34	0,137	0,013
	Fosfato de sodio	4,78	0,227	0,024
Cerebelo	Tris-HCl	5,30	0,147	0,014
	Fosfato de sodio	4,78	0,286	0,030

Las condiciones de incubación se encuentran detalladas en métodos. La actividad enzimática se midió en la fracción S, utilizándose los buffers indicados en el texto a pH 7,4 para la extracción de la proteína.

Los errores en las determinaciones de la actividad no exceden el 1 - 2%.

A pesar que en estas condiciones el buffer Tris-HCl extrae un 10% más de proteína que el buffer fosfato de sodio, la actividad es mayor en este último.

En cuanto al pH de extracción se analizó el efecto del empleo del buffer fosfato de sodio 50 mM a los pH's 6,8; 7,4 y 8,0 (Tabla R-I.2.).

TABLA R-I.2.: Efecto del pH del buffer de extracción

Fuente enzimática	pH	Proteína extraída (mg / ml)	Porfirinas formadas	
			Actividad (nmoles)	A.E. (nmoles / mg)
Corteza cerebral	6,8	4,38	0,063	0,007
	7,4	4,42	0,223	0,025
	8,0	4,69	0,497	0,053
Cerebelo	6,8	4,56	0,071	0,008
	7,4	4,54	0,272	0,030
	8,0	5,40	0,875	0,081

Las condiciones de incubación se encuentran detalladas en métodos. La actividad enzimática se midió en la fracción S, utilizándose el buffer fosfato de sodio a los pH's indicados para la extracción de la proteína.

Los errores en las determinaciones de la actividad no exceden el 1 - 2%.

De acuerdo con la actividad de la proteína extraída y su correspondiente actividad específica, se seleccionó el buffer fosfato de sodio 50 mM pH 8,0 como buffer de extracción.

Por otra parte se analizaron por HPLC las porfirinas formadas en incubaciones de la fracción H y S de ambas fuentes.

Tanto el homogenato de corteza cerebral (Figura R-I.1.A.) como el de cerebelo (Figura R-I.1.B.) muestran en el cromatograma la formación de uroporfirina III (80%), uroporfirina I (9%) y heptaporfirina III (11%). La incubación de la fracción sobrenadante produjo la síntesis de los mismos productos pero en distinta proporción a la de la fracción H, siendo para uroporfirina III 89% y 86%, para uroporfirina I 7% y 8% y para heptaporfirina III 4% y 6% (Figuras R-I.2.A. y R-I.2.B.) considerando corteza cerebral y cerebelo de rata respectivamente.

Como puede observarse en los cromatogramas las preparaciones tienen una actividad muy baja de URO-D. Es muy

probable que las condiciones de incubación de la enzima PBG-D no coincidan con las óptimas para la URO-D, especialmente en cuanto a la atmósfera de incubación y al pH.

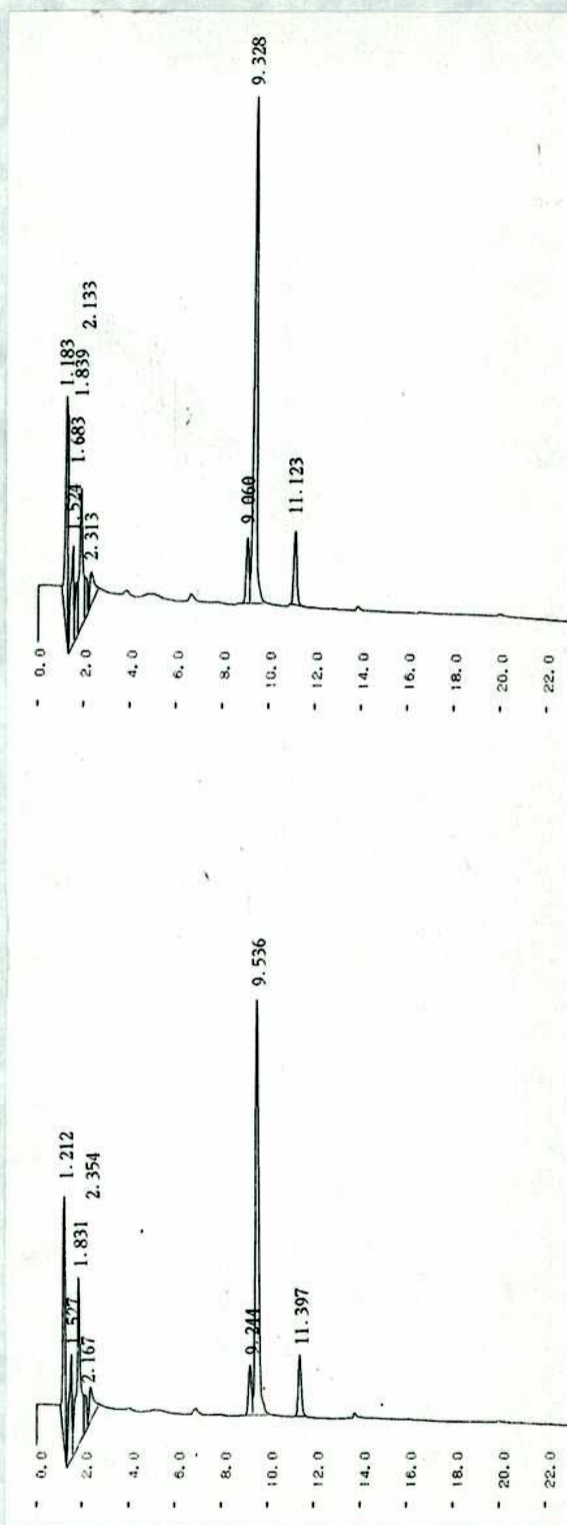


FIGURA R-I.1.: Tipo isomérico de las porfirinas sintetizadas, en incubaciones de la fracción H de corteza cerebral (A) y de cerebelo (B) de rata, obtenido por cromatografía en HPLC.

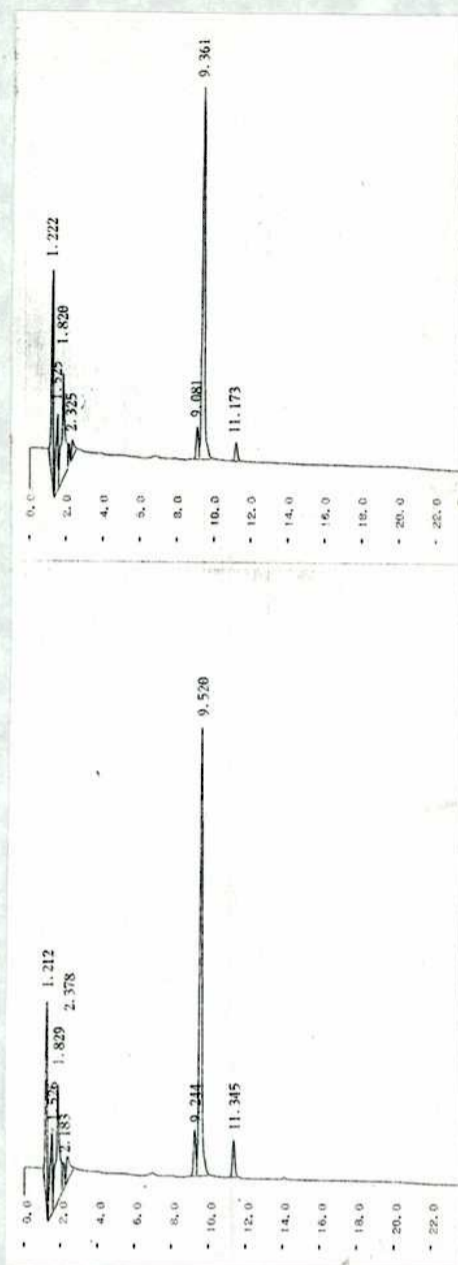


FIGURA R-I.2.: Tipo isomérico de las porfirinas sintetizadas, en incubaciones de la fracción S de corteza cerebral (A) y de cerebelo (B) de rata, obtenido por cromatografía en HPLC.

I.2.3. Obtención de la PBG-D. Efecto de la temperatura y del tiempo de calentamiento sobre el tipo isomérico y las porfirinas formadas

Al igual que en otros tejidos la Isomerasa de corteza cerebral y de cerebelo, es una enzima termolábil mientras que la Deaminasa es termoestable. Debido a esta propiedad, el calentamiento constituye uno de los procedimientos más frecuentemente empleados para separar ambos componentes del complejo PBGasa y purificar la PBG-D.

Para estudiar el efecto de la temperatura y del tiempo de calentamiento se llevó a cabo la siguiente experiencia. La fracción S se mantuvo en un baño de agua a las temperaturas y durante los tiempos indicados en las Figuras R-I.3. y R-I.5. Concluido cada tratamiento las preparaciones se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo y se centrifugaron a 18000xg durante 10 min, separándose así la proteína precipitada. Se determinó la actividad enzimática en cada sobrenadante.

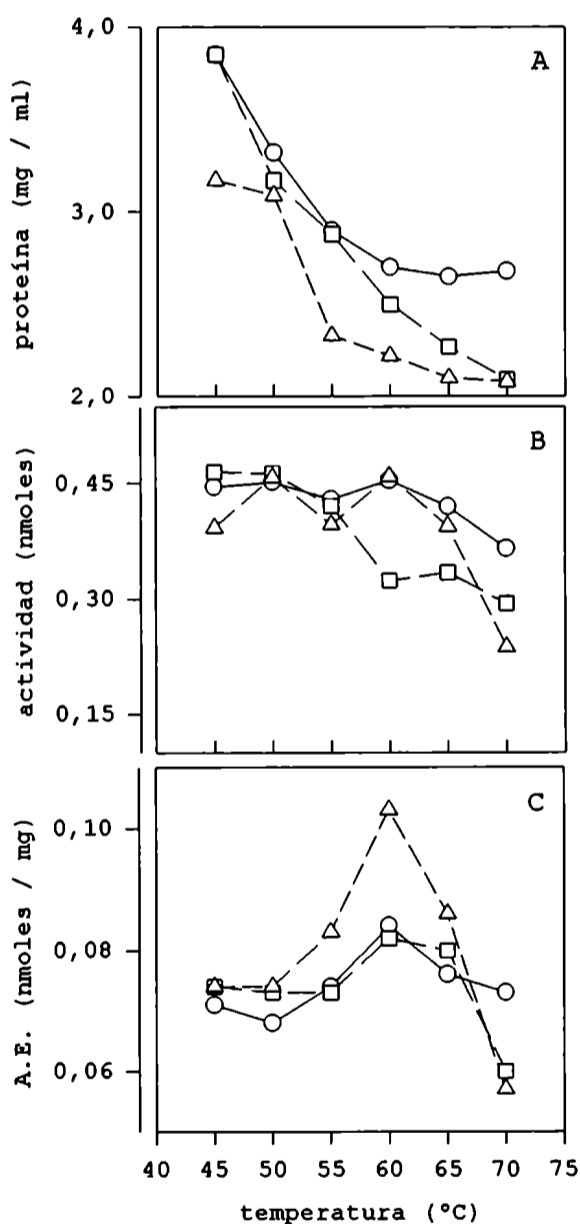


FIGURA R-I.3.: Efecto de la temperatura y del tiempo de calentamiento sobre la cantidad de proteína (A), actividad (B) y actividad específica (A.E.) de la fracción S de corteza cerebral de rata, calentada durante (○) 5 min, (□) 10 min y (Δ) 20 min. El sistema de incubación se detalla en métodos. Los errores en las determinaciones de la actividad no exceden el 1 - 2%.

En la Figura R-I.3.A. se observa que por acción del calentamiento las proteínas totales de corteza cerebral disminuyen, el efecto es mayor a medida que aumenta el tiempo y la temperatura. Los datos de actividad (Figura R-I.3.B.) no revelan ningún efecto de activación, como se ha observado para esta enzima en otras fuentes (Batlle & Rossetti, 1977). En cuanto a la actividad específica, alcanza un máximo luego de 20 min de calentamiento a 60°C (Figura R-I.3.C.)

Analizando por HPLC el tipo de porfirinas formadas se observa que no hay actividad de decarboxilasa, aún considerando las temperaturas más bajas y el menor tiempo de calentamiento ensayados (Figura R-I.4.A.). En estas condiciones (45°C, 5 min) la enzima formó tanto uroporfirina I (21%) como uroporfirina III (79%). Sin embargo, esta relación se invirtió hasta obtener datos de 80% y 20% para los isómeros I y III, respectivamente (Figura R-I.4.B.) al calentar a 60°C durante 20 min. Los cromatogramas que aquí se muestran constituyen perfiles típicos obtenidos durante las experiencias de calentamiento.

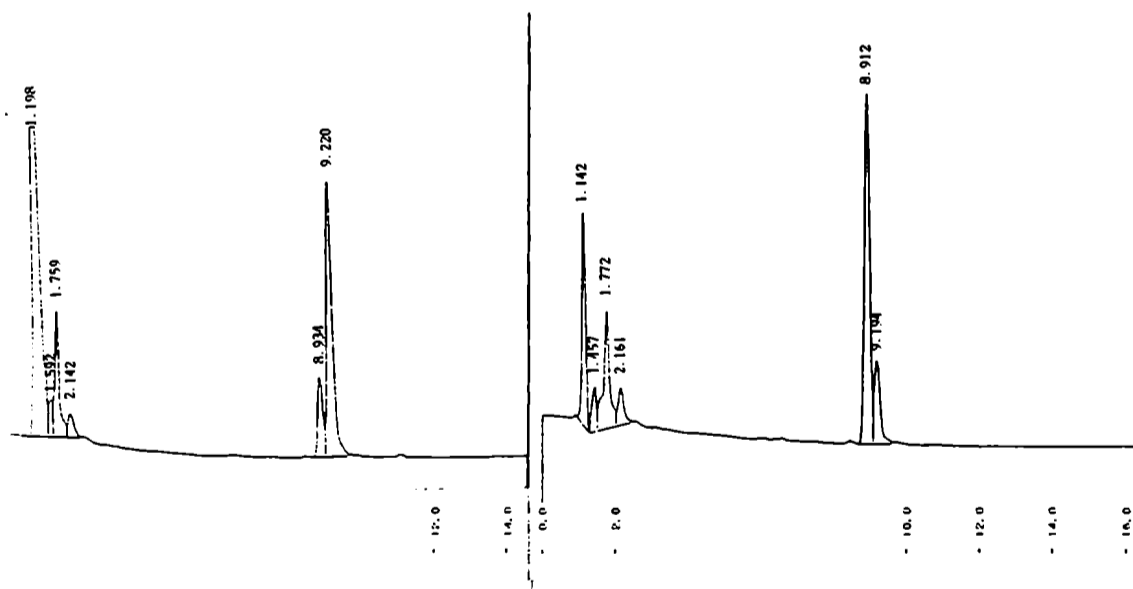


FIGURA R-I.4.: Tipo isomérico de las porfirinas formadas por incubación de la fracción S de corteza cerebral calentada a 45°C durante 5 min (A) y a 60°C por 20 min (B), cromatograma obtenido por HPLC.

De acuerdo con estos resultados, se consideró que un calentamiento a 60°C durante 20 min era el más conveniente para

obtener la PBG-D de corteza cerebral. Si bien en estas condiciones no hay inactivación total de la Isomerasa, la cual se logra a 70°C durante 20 min, la actividad es la más adecuada para nuestros propósitos.

Con la PBG-D de cerebelo se ensayaron las mismas temperaturas y tiempos de calentamiento empleados para la enzima de corteza cerebral (Figura R-I.5.).

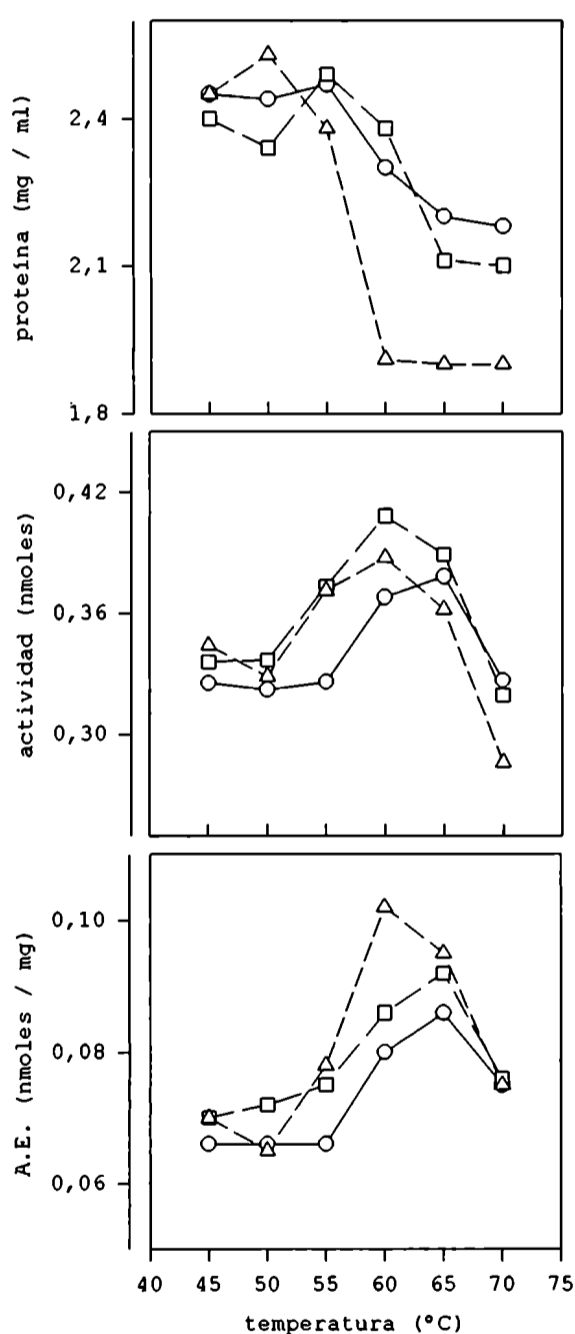


FIGURA R-I.5.: Efecto de la temperatura y del tiempo de calentamiento sobre la cantidad de proteína (A), actividad (B) y actividad específica de la fracción S de cerebelo de rata calentada durante (O) 5 min, (□) 10 min y (Δ) 20 min. El sistema de incubación se detalla en métodos. Los errores en las determinaciones de la actividad no exceden el 1 - 2%.

Las Figuras R-I.5.A. y R-I.5.B. nos muestran que la PBG-D de cerebelo no exhibe una respuesta similar a la de corteza cerebral pero el gráfico de actividad específica (Figura R-I.5.C) refleja el mismo comportamiento para ambas enzimas coincidiendo en que el calentamiento durante 20 min a 60°C es el más conveniente para la separación de la PBG-D. Respecto al tipo isomérico de las uroporfirinas formadas, el calentamiento a 45°C durante 5 min produjo una inactivación parcial de la isomerasa sintetizándose un 70% de uroporfirina III (Figura R-I.6.A.). Este resultado se transformó en un 84% de uroporfirina I cuando esta fracción se calentó durante 20 min a 60°C (Figura R-I.6.B.).

Por cuanto la inactivación total de la Isomerasa, se logra luego de calentar (70°C, 10 y 20 min), se produce en condiciones que también afectan la actividad de la PBG-D, se consideró más conveniente calentar la fracción S a 60°C durante 20 min.

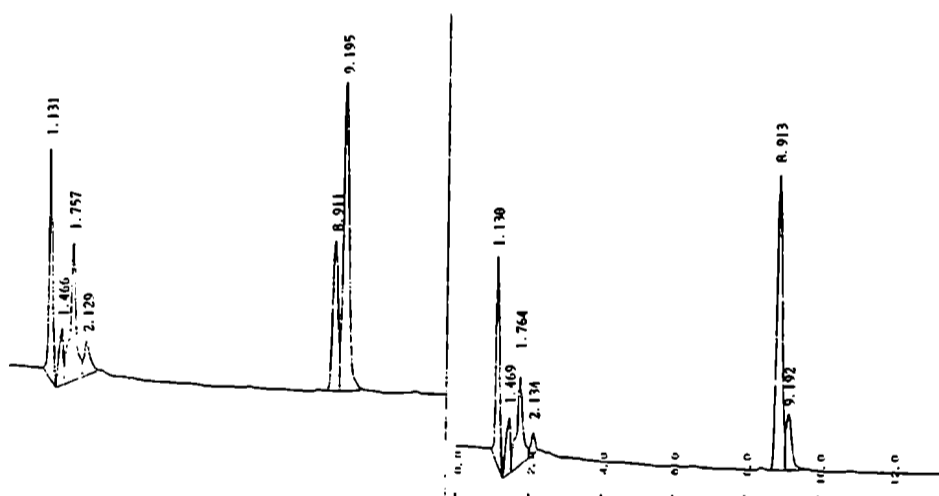


FIGURA R-I.6.: Cromatograma, obtenido por HPLC, del tipo isomérico de las porfirinas sintetizadas en incubación de la fracción S de cerebelo de rata calentada a 45°C durante 5 min (A) y a 60°C por 20 min (B).

I.3. Purificación parcial de la PBG-D

En los items I.2.2. y I.2.3. se describieron los ensayos preliminares realizados para obtener una fracción de Deaminasa.

Se detalla a continuación la secuencia de pasos establecidos para la purificación parcial de la PBG-D de ambas fuentes:

Etapa 1: HOMOGENATO (H): Se preparó según se describe en el ítem I.2.2. El tejido se homogeneizó en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 8,0 en una relación 1:10 (g tejido fresco : ml buffer).

Etapa 2: SOBRENADANTE de 4500xg (S): Por centrifugación del homogenato a 4500xg durante 20 min se separó el sobrenadante y se descartó el pellet.

Etapa 3: SOBRENADANTE de 105000xg (Su): Se centrifugó el sobrenadante obtenido en el paso anterior, a 105000xg durante 1 h. Se separó el sobrenadante y se descartó el pellet.

Etapa 4: SOBRENADANTE de CALENTAMIENTO (SØ): El sobrenadante de la etapa anterior se calentó a 60°C durante 20 min y luego se enfrió inmediatamente en hielo. Por centrifugación a 18000xg durante 10 min se obtuvo la fracción denominada sobrenadante de calentamiento.

Etapa 5: FRACCIONAMIENTO con SULFATO de AMONIO (F): El sobrenadante de calentamiento se trató con sulfato de amonio sólido hasta un 30% de saturación. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se llevó hasta 90% de saturación. Durante todo el proceso el pH se mantuvo neutro por agregado de amoníaco conc.. Luego de 40 min de agitación se centrifugó a 18000xg durante 10 min separándose el pellet que corresponde a la fracción 30-90%.

Para las mediciones de actividad enzimática, este precipitado se resuspendió en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 8,0 y se desaló por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25 grueso.

Etapa 6: CROMATOGRAFIA en SEPHACRYL S-200 (S-200): El precipitado de la fracción 30-90% se resuspendió en el

menor volumen de buffer fosfato de sodio 50 mM pH 8,0 y se sembró en una columna de Sephacryl S-200. La proteína se eluyó con el mismo buffer con un flujo de 15 ml/h.

La Figura R-I.7. muestra un perfil típico de elución proteica y de actividad enzimática de una columna de Sephacryl S-200, donde se obtiene un solo pico de actividad tanto para la PBG-D de corteza cerebral (A) (volumen de elución: 84 - 117 ml), como para la PBG-D de cerebelo (B) (volumen de elución: 85,5 - 112 ml) de rata.

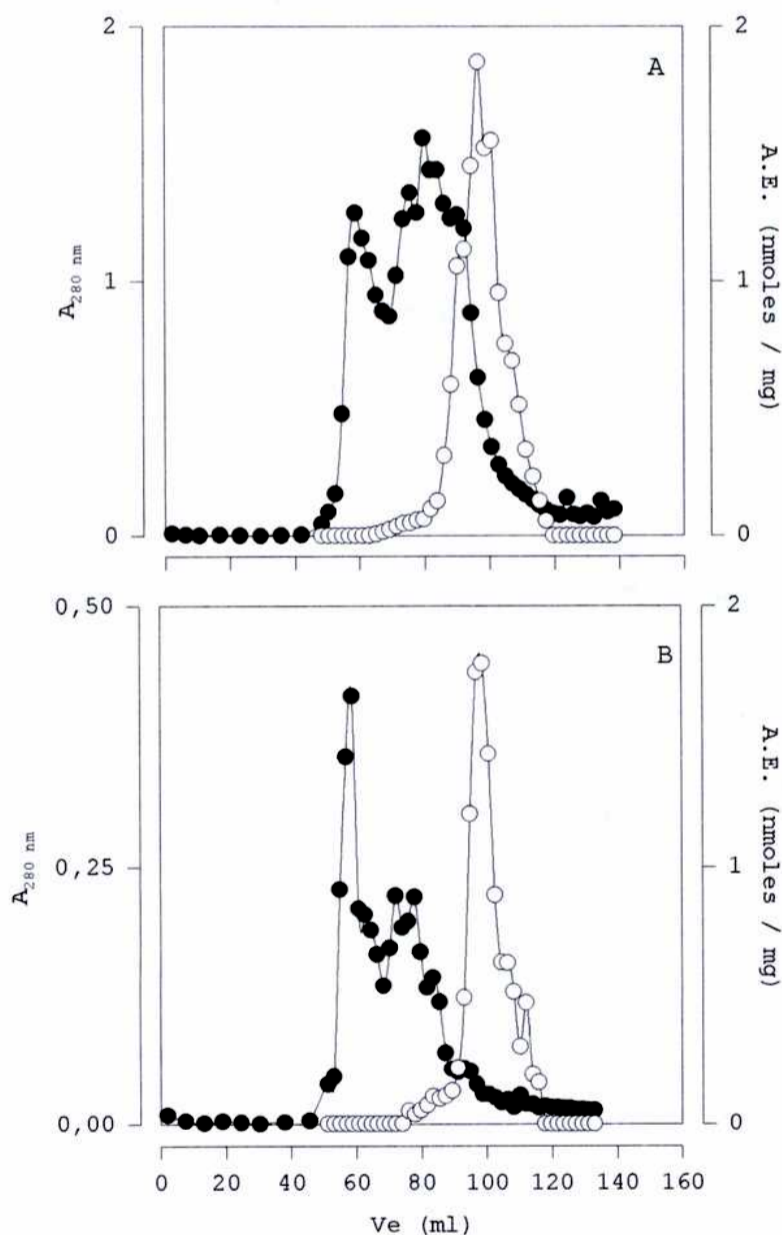


FIGURA R-I.7.: Perfil típico de elución de la fracción F de corteza cerebral (A) y de cerebelo (B) a través de una columna de Sephacryl S-200 Ve: volumen de elución; (●) $A_{280 \text{ nm}}$; (○) A.E: actividad específica.

En la Tabla R-I.3. se encuentran los resultados obtenidos durante la purificación de la PBG-D de corteza cerebral.

TABLA R-I.3.: Purificación de la PBG-D de corteza cerebral de rata

FRACCION	PROTEINA TOTAL (mg)	UNIDADES TOTALES (nmoles)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmoles/mg)	PURIFICACION	RENDI- MIENTO. (%)
1.H	1557,1	13,72	0,009	1	-
2.S	611,1	32,58	0,053	5,9	100
3.Su	416,3	23,30	0,056	6,2	71,5
4.SØ	215,8	22,23	0,103	11,4	68
5. F	-	-	0,465 (*)	52,0	-
6. Seph S-200	27,8	16,66	1,865 (pico)	206,5	51

El sistema de incubación contenía 2 ml de extracto enzimático, 30 µg de PBG y buffer fosfato de sodio 50 mM pH 8,0 hasta completar un volumen de 3 ml. En el caso de las fracciones eluidas de la columna Sephacryl S-200 se redujo el sistema a la mitad. El resto de las condiciones fueron las standard.

(*) Dato correspondiente a una alícuota desalada.

Se obtuvo una fracción purificada 206 veces con un rendimiento del 51%. Es de hacer notar el aumento en las unidades totales al comparar las fracciones H y S, hecho que ya fue observado durante la purificación de esta enzima de otras fuentes (Rossetti & Batlle, 1977; Juknat et al., 1981; Kotler et al., 1987). Este incremento de unidades totales podría estar relacionado con la existencia de un factor regulador de la actividad de PBGasa y de PBG-D, ya encontrado en *Euglena gracilis* (Juknat et al. 1981) e identificado como una 6-biopterina (Juknat et al., 1988a, b). Sin embargo, en este trabajo no se ha investigado esta posibilidad.

Los resultados correspondientes a la purificación de la PBG-D de cerebelo de rata se encuentran en la Tabla R-I.4.

TABLA R-I.4.: Purificación de la PBG-D de cerebelo de rata

FRACCION	PROTEINA TOTAL (mg)	UNIDADES TOTALES (nmoles)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (nmoles/mg)	PURIFICACION	RENDI- MIENTO. (%)
1.H	973,10	21,76	0,022	1	-
2.S	291,70	22,67	0,077	3,5	100
3.Su	205,80	19,55	0,094	4,3	86
4.SØ	109,90	11,35	0,103	4,7	50
5.F	-	-	0,621 (*)	28,2	-
6. Seph S-200	7,96	3,16	1,780 (pico)	81	7

El sistema de incubación contenía 2 ml de extracto enzimático, 30 µg de PBG y buffer fosfato de sodio 50 mM pH 8,0 hasta completar un volumen de 3 ml. En el caso de las fracciones eluidas de la columna Sephacryl S-200 se redujo el sistema a la mitad. El resto de las condiciones fueron las standard.

(*) Dato correspondiente a una alícuota desalada.

Se obtuvo una fracción purificada 81 veces con una recuperación de unidades del 7%. Este bajo rendimiento podría deberse a una inactivación rápida de la proteína durante la corrida por Sephacryl, debido probablemente a efectos de dilución. En experiencias futuras se realizará la purificación en presencia de agentes reductores como el DTT, de agentes quelantes como el EDTA, de sales como el KCl para mantener la fuerza iónica y de inhibidores de proteasas.

La PBG-D de ambas fuentes es una proteína citosólica. En las primeras etapas de purificación no se detectó actividad en los precipitados obtenidos en las centrifugaciones a 4500xg, 14000xg y 105000xg. Por cuanto luego de estas dos últimas se obtenían sobrenadantes con el mismo grado de purificación, pero se perdían unidades enzimáticas, se decidió emplear solamente la etapa de ultracentrifugación que producía finalmente un sobrenadante más claro.

I.4. Propiedades

I.4.1. Efecto de la cantidad de proteína

Se decidió estudiar el efecto de la cantidad de proteína sobre la actividad de PBG-D empleando como fuente enzimática la fracción desalada.

Las porfirinas formadas aumentan linealmente con cantidades crecientes de proteína en el rango estudiado tanto en la corteza cerebral ($r= 0,999$) (Figura R-I.8.A.) como en el cerebelo de rata ($r= 0,998$) (Figura R-I.8.B.).

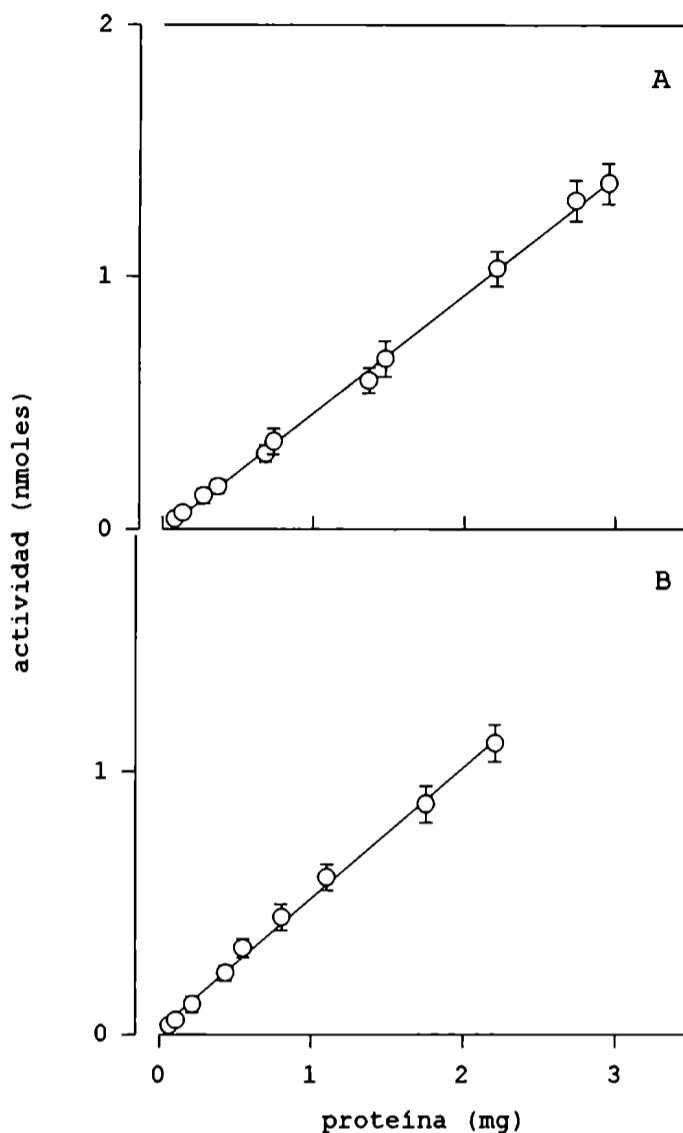


FIGURA R-I.8.: Efecto de la cantidad de proteína sobre la actividad de PBG-D de corteza cerebral (A) y de cerebelo de rata (B). El sistema de incubación y la determinación de porfirinas se detallan en métodos. La cantidad de proteína original fue de (A) 1,478 mg/ml y (B) 2,214 mg/ml.

I.4.2. Efecto del tiempo de incubación

Al estudiar el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática en callos de soja (Llambias & Batlle, 1971a), en *E. gracilis* (Rossetti & Batlle, 1977; Rossetti et al., 1987; Battersby et al., 1982) y en eritrocitos (Smythe & Williams, 1988) se observó una fase lag en la síntesis de uroporfirinógenos, lo cual estaba sugiriendo la formación de intermediarios polipirrólicos durante la reacción de ciclotetramerización enzimática de PBG. En base a estos

anteriores se decidió analizar el efecto del tiempo sobre la actividad enzimática en nuestros sistemas.

En la Figura R-I.9.A. se observa que la formación de porfirinas en la corteza cerebral muestra un lag de 10 min, luego del cual aumenta linealmente ($r= 0,986$) hasta las 2 h de incubación. Estos resultados están de acuerdo con los hallados por Smythe & Williams (1988) quienes describieron una fase lag de 7 min a pH 8,3 para la PBG-D de eritrocitos humanos.

En cambio la formación de porfirinas en cerebelo (Figura R-I.9.B.) mostró un incremento lineal con el tiempo ($r= 0,999$).

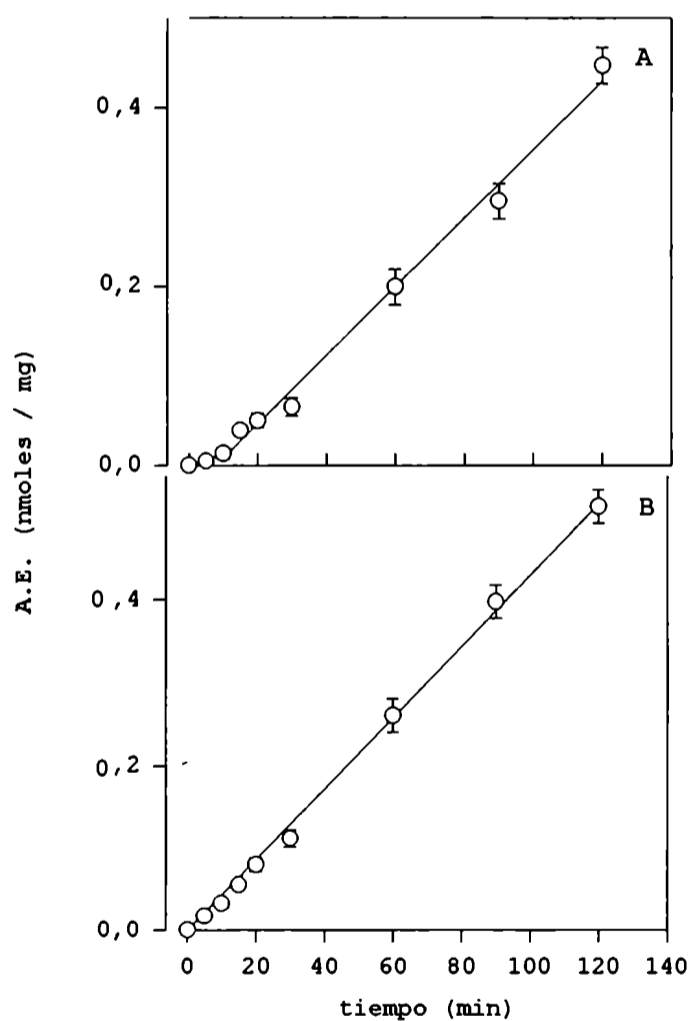


FIGURA R-I.9.: Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la PBG-D de corteza cerebral (A) y de cerebelo (B) de rata. El sistema de incubación se detalla en métodos excepto que se empleó 0,5 ml de fracción enzimática F. La concentración de proteína fue de (A) 1,478 mg/ml y (B) 1,107 mg/ml.

I.4.3. Efecto de la concentración de sustrato.

En muy diversas fuentes se ha descrito que la PBG-D se comporta como una enzima típicamente michaeliana (Sancovich et al., 1969a, b; Frydman & Frydman, 1970; Llambias et al., 1971b; Jordan & Shemin, 1973; Frydman & Feinstein, 1974; Williams et al., 1981; Kotler et al., 1987; Smythe & Williams, 1988).

Cuando se investigó el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad de la PBG-D de corteza cerebral y cerebelo de rata (Figuras R-I.10.), se encontró que también exhiben un comportamiento clásico de Michaelis-Menten con curvas de saturación hiperbólicas. Se alcanza la saturación en la formación de porfirinas a 50 μM de PBG para ambas enzimas.

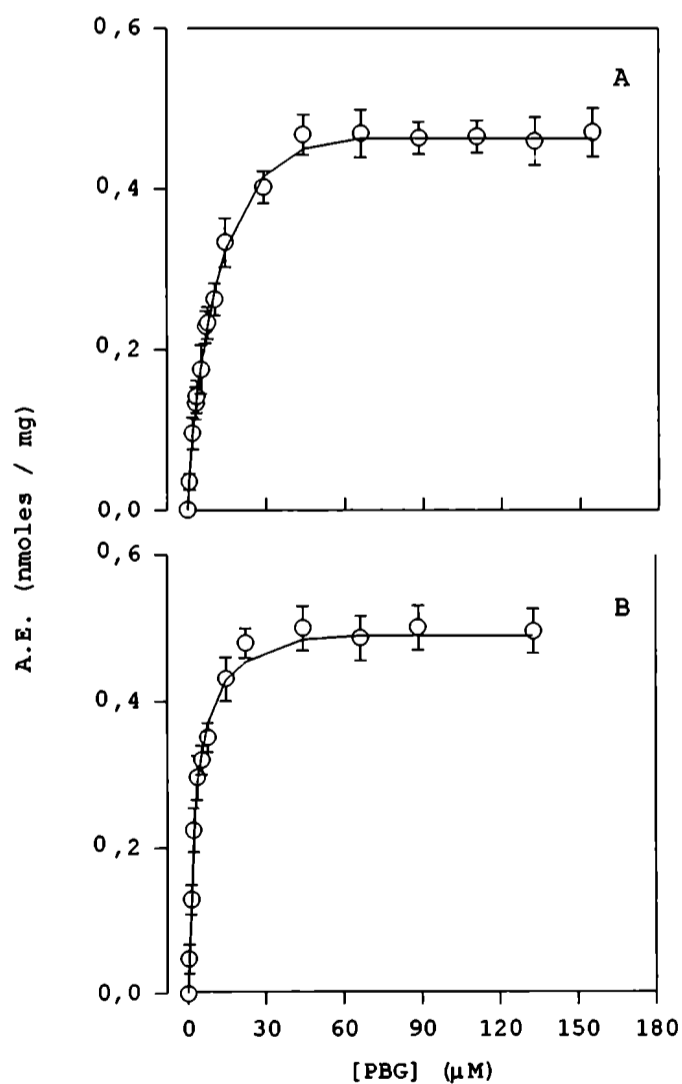


FIGURA R-I.10.: Curva de sustrato de la PBG-D corteza cerebral (A) y de cerebelo (B) de rata. El sistema de incubación se detalla en métodos excepto que se empleó 0,5 ml de fracción enzimática F. Se utilizó una concentración de proteína de 1,478 mg/ml (A) y 1,107 mg/ml (B).

I.4.4. Estudios cinéticos

La cinética hiperbólica que presenta la PBG-D se confirma mediante los gráficos de dobles recíprocas. Las representaciones de Lineweaver-Burk resultaron lineales para la enzima de corteza cerebral ($r= 0,999$) (Figuras R-I.11.A.) y de cerebelo ($r= 0,990$) (Figura R-I.11.B.) de rata. También en ambos casos el valor calculado para el coeficiente n de Hill fue 1.

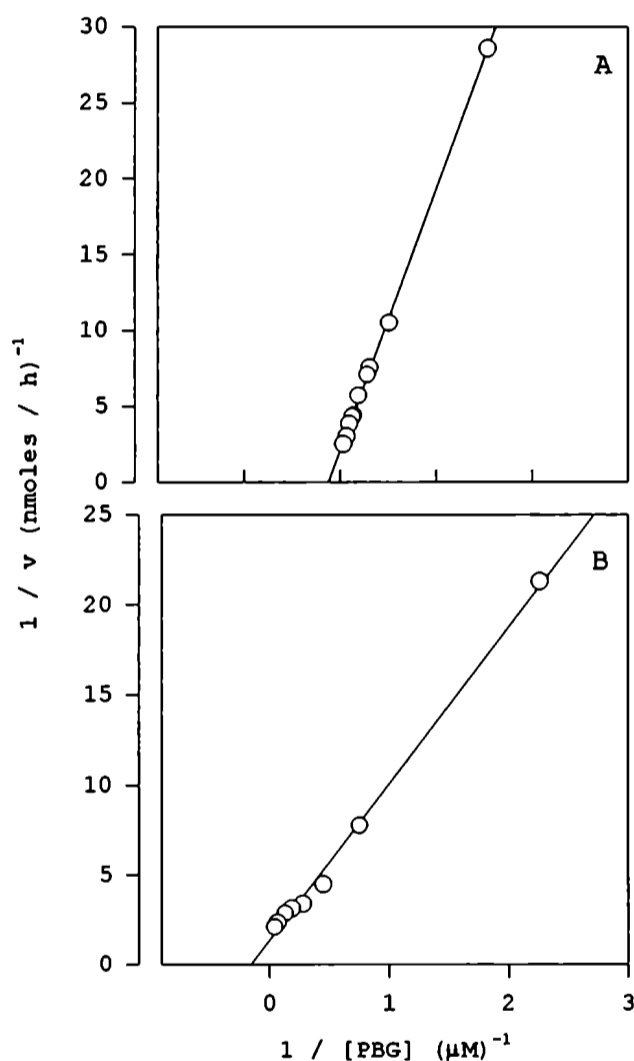


FIGURA R-I.11.: Gráfico de Lineweaver-Burk para la PBG-D de corteza cerebral (A) y de cerebelo (B) de rata.

En la Tabla R-I.5. se encuentran los valores de las constantes cinéticas aparentes K_m y $V_{máx.}$ calculados a pH 8,0 en base a los gráficos de las Figuras R-I.10.A. y R-I.10.B.

TABLA R-I.5.: Constantes cinéticas aparentes

Fuente enzimática	Km (μM)	Vmáx. (nmoles/h)	n (Hill)
Corteza cerebral	8,34	0,179	1
Cerebelo	7,78	0,218	1

Los Km's obtenidos están dentro del orden de los encontrados para esta enzima de otras fuentes, como por ejemplo bazo de rata ($1\mu\text{M}$) (Williams, 1984) y glándula de Harder de rata ($2,4\mu\text{M}$) (Cardalda et al., 1995).

I.4.5. Estabilidad frente al estacionamiento

Durante las distintas etapas de purificación de una proteína es común tener que mantener fracciones enzimáticas a bajas temperaturas por diferentes periodos, para luego utilizarlas en estudios posteriores.

Se ensayó entonces la estabilidad de la PBG-D obtenida de ambas fuentes manteniéndolas a 4°C y a -17°C durante diferentes tiempos. La Figura R-I.12.A. para la PBG-D de corteza cerebral muestra un incremento del 15% en la actividad a los 2 días de estacionamiento a -17°C . Luego la misma decrece al valor control y se mantiene durante 50 días.

La Figura R-I.12.B., correspondiente a la enzima de cerebelo, muestra un comportamiento semejante a la anterior durante el estacionamiento a -17°C , pero en este caso el incremento se observa al sexto día. A los 93 días la actividad es de un 76% respecto al control a tiempo cero y a los 147 días todavía es de un 64%.

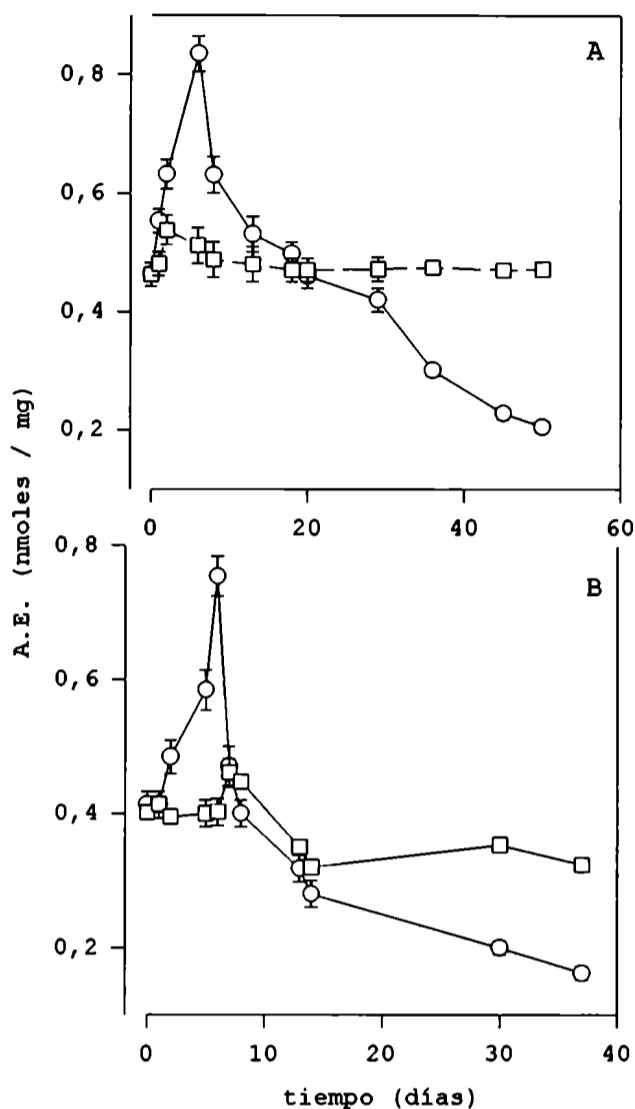


FIGURA R-I.12.: Curva de estabilidad de la PBG-D de corteza cerebral (A) y de cerebelo (B) de rata mantenidas a 4°C (○) y a -17°C (□). El sistema de incubación se detalla en métodos. Se empleó 0,5 ml de fracción enzimática F con una concentración de proteína de 1,478 mg/ml (A) y 1,107 mg/ml (B).

Cuando las muestras se mantuvieron en heladera a 4°C, se observaron aumentos de un 80% a los 2 días para la enzima de corteza cerebral (Figura R-I.12.A.) y de un 88% a los 6 días en cerebelo (Figura R-I.12.B.).

Este fenómeno de activación espontánea por estacionamiento ya fue observado en fracciones de homogenato y sobrenadante de *Euglena gracilis* (Juknat et al., 1981). Como hemos mencionado, estudios posteriores demostraron la presencia en dichas fracciones de un factor de estructura de 6-biopterina (Juknat et al., 1988a, b) el cual regulaba la actividad de la PBG-D.

I.4.6. Determinación del Peso Molecular

Para determinar el peso molecular de la PBG-D obtenida de ambas fuentes se sembró en la columna de Sephacryl S-200, calibrada según se indica en la Figura M-II.5., la fracción activa proveniente de la etapa 6 de purificación, previamente concentrada.

Los pesos moleculares obtenidos fueron de 46700 ± 4700 Da y 43000 ± 4300 Da para la PBG-D de corteza cerebral y cerebelo de rata respectivamente.

Estos PM son del orden de los ya reportados para esta enzima de otras fuentes (Batlle & Rossetti, 1977; Juknat et al., 1994).

I.5. Efecto del ácido fólico y de la sulfamerazina

En 1969 Sancovich et al. publicaron evidencias de la presencia de un factor ultrafiltrable que estimulaba la formación de uroporfirinógenos a partir de PBG en hígado bovino. Posteriormente Piper & Tephly (1974, 1975) aislaron un factor de hígado de rata, el que protegía a la enzima PBG-D de la inhibición ejercida por el plomo. Este factor fue purificado del citosol hepático sugiriéndose para el mismo una estructura de pteroilpoliglutamato (Piper & van Lier, 1977).

Por otro lado Kohashi et al. (1984) purificaron la enzima Isomerasa de hígado de rata, demostrando que un pteroilglutamato reducido actuaría como cofactor en la formación de UROgen III. Paralelamente en nuestro laboratorio se detectó y se aisló de fracciones homogenato y sobrenadante de *Euglena gracilis* Z crecida en oscuridad, un factor dializable, termoestable y de bajo peso molecular, que poseía la capacidad de regular la síntesis de porfirinógenos a partir de PBG, demostrándose que su efecto activante sobre la PBGasa era similar al producido por el

ácido fólico (Figura R-I.13.) en concentraciones de orden de 0,1 μM (Juknat et al., 1981). Por todas las evidencias acumuladas se comenzó a aplicar el tratamiento con ácido fólico (30 mg/día en forma oral, durante 10 días) a pacientes con PAI lográndose una recuperación clínica y bioquímica de los mismos (Wider et al., 1980).

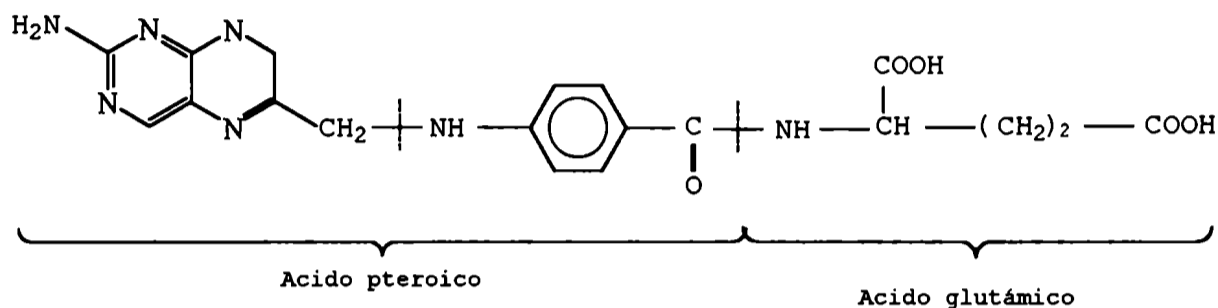


FIGURA R-I.13.: Estructura del ácido fólico

Posteriormente, el factor aislado de *Euglena gracilis* fue purificado mediante el empleo de técnicas de filtración por geles, intercambio iónico y cromatografía en papel (Juknat et al., 1988a). Los espectros de absorción y de fluorescencia permitieron revelar la presencia de una pteridina no conjugada. Por espectroscopía FTIR y ^1H -RMN se confirmó para el factor una estructura de una 6-biopterina (Juknat et al., 1988b).

Por otro lado, es de nuestro conocimiento que drogas tales como las sulfonamidas provocan ataques de porfiria aguda (Stein & Tschudy, 1970; Eales, 1971). Peters et al. (1980) observaron el efecto inhibitorio producido por varias sulfonamidas sobre la actividad *in vitro* de la PBG-D en hígado de rata. Inyectando sulfamerazina (SMZ) (Figura R-I.14.) (1 g/kg) a dichos animales se produjo un incremento de 2,2 veces en la actividad del ALA-S y una disminución en los contenidos de hemo hepático microsomal (33%) y de citocromo P_{450} (41%) pero sin afectar la actividad de la hemo-oxigenasa (Peters et al., 1980). Por lo descripto se resolvió emplear a la SMZ para inducir modelos experimentales de porfiria aguda.

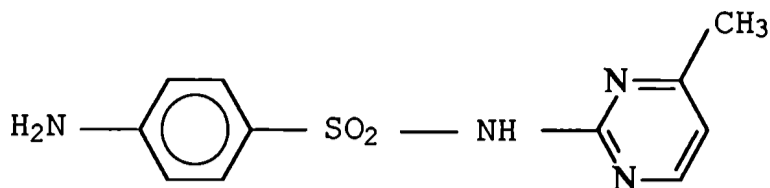


FIGURA R-I.14.: Estructura de la sulfamerazina

Experiencias realizadas en nuestro laboratorio mostraron que la inyección i.p. de SMZ (1 g/kg) a ratas produjo un inhibición del 30% en la actividad de la PBG-D de sangre (Kotler et al., 1988a). En incubaciones *in vitro* empleando 3,0 mM de SMZ se obtuvo una inhibición del 55% de la actividad de dicha enzima, pudiéndose revertir la misma (91 - 97%) por agregado de ácido fólico (2,0 - 4,0 mM) (Kotler et al., 1988b).

Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de Christenson et al. (1986) quienes postularon un sitio regulatorio para el folato en la PBG-D. Debido a la estructura p-aminobenzoil, común entre ambos compuestos, es probable que la SMZ se una a dicho sitio y sea posteriormente desplazada por agregado de ácido fólico.

Noriega et al. (1992) demostraron la existencia de sitios para el folato en la PBG-D de hígado de rata. De acuerdo con la fracción enzimática empleada, dichos sitios se encontraron disponibles u ocupados. Los estudios cinéticos efectuados a concentraciones variables de ácido fólico (0 - 2,0 mM) y sustrato (14 - 50 μ M) permitieron definir a este compuesto como un activador no esencial ($\alpha = 1$; $\beta = 1,6$) de la PBG-D de hígado de rata.

En base a estos antecedentes se resolvió estudiar el efecto de la SMZ y del ácido fólico sobre la actividad enzimática en nuestros sistemas. Dado que la acción de estos compuestos varía con la concentración de sustrato, todas las experiencias se realizaron a concentraciones finales variables tanto de SMZ y ácido fólico como de PBG.

La Figura R-I.15. muestra los resultados obtenidos en incubaciones de PBG-D de corteza cerebral y de cerebelo de rata empleando SMZ (0-2,0 mM) a dos concentraciones distintas de PBG, 14 μM (no saturante) y 60 μM (saturante).

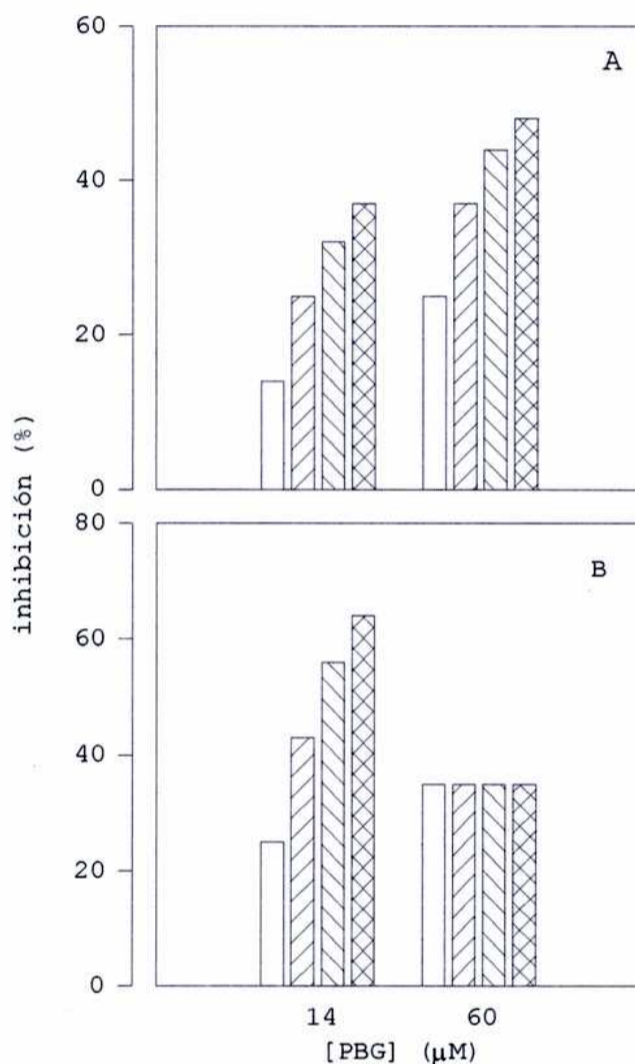


FIGURA R-I.15.: Efecto de distintas concentraciones de SMZ sobre la PBG-D de corteza cerebral (A) y cerebelo de rata (B). Se empleó 0,5 ml de fracción enzimática F y 0,1 mM (\square); 0,3 mM (diagonal lines); 1,0 mM (cross-hatch) y 2,0 mM (checkered) de SMZ. La concentración de proteína fue de 1,478 mg/ml (A) y 1,107 mg/ml (B). El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos. Los porcentajes se expresan con respecto al control incubado sin SMZ.

La Figura R-I.15.A. muestra que a todas las concentraciones ensayadas la SMZ ejerce un efecto inhibitorio, siendo éste mayor a 60 μM de sustrato (48% de inhibición a 2,0 mM de SMZ). Es interesante resaltar que la concentración saturante de PBG produce un incremento en la inhibición ejercida por la SMZ.

Cuando se estudió el efecto sobre la PBG-D de cerebelo (Figura R-I.15.B.) se observa que a 14 μM la inhibición aumenta con la concentración de SMZ alcanzando un 64% a 2,0 mM. Sin embargo en incubaciones con 60 μM se obtiene una inhibición del 35% para todas las concentraciones de SMZ ensayadas, indicando que se alcanzó una $V_{\text{máx}}$ aparente constante.

Las inhibiciones obtenidas con la SMZ están de acuerdo con los resultados publicados por Peters et al. (1980) para la PBG-D de hígado de rata (50% de inhibición para 1,0 mM de SMZ) y por Kotler et al. (1988b) para sangre (55% de inhibición para 3,0 mM de SMZ).

En cuanto al ácido fólico (0 - 1,0 mM) los resultados mostraron efectos duales. Analizando los datos para la PBG-D de corteza cerebral (Figura R-I.16.A.) 0,05 mM de ácido fólico produjo una significativa activación del 15% ($p < 0,005$) y del 22% ($p < 0,005$) para 14 μM (concentración no saturante) y 60 μM (saturante) de PBG respectivamente. A concentraciones mayores de ácido fólico aparece un efecto inhibitorio, siendo éste de 55% para 0,5 mM de fólico y 14 μM de PBG, mientras que para 1,0 mM la inhibición es total.

La Figura R-I.16.B. muestra los resultados correspondientes a la PBG-D de cerebelo de rata. A concentraciones no saturantes de sustrato (14 μM) solamente se observa efecto inhibitorio alcanzando el 100% a 0,5 mM de ácido fólico. Sin embargo el efecto dual aparece a 60 μM de PBG, siendo la activación de un 12% ($p < 0,005$) para 0,05 mM de fólico y la inhibición de un 100% a 1,0 mM del efector. Estos resultados obtenidos con el ácido fólico fueron llamativos, dado que hasta el momento sólo se habían encontrado efectos activantes o nulos para el mismo.

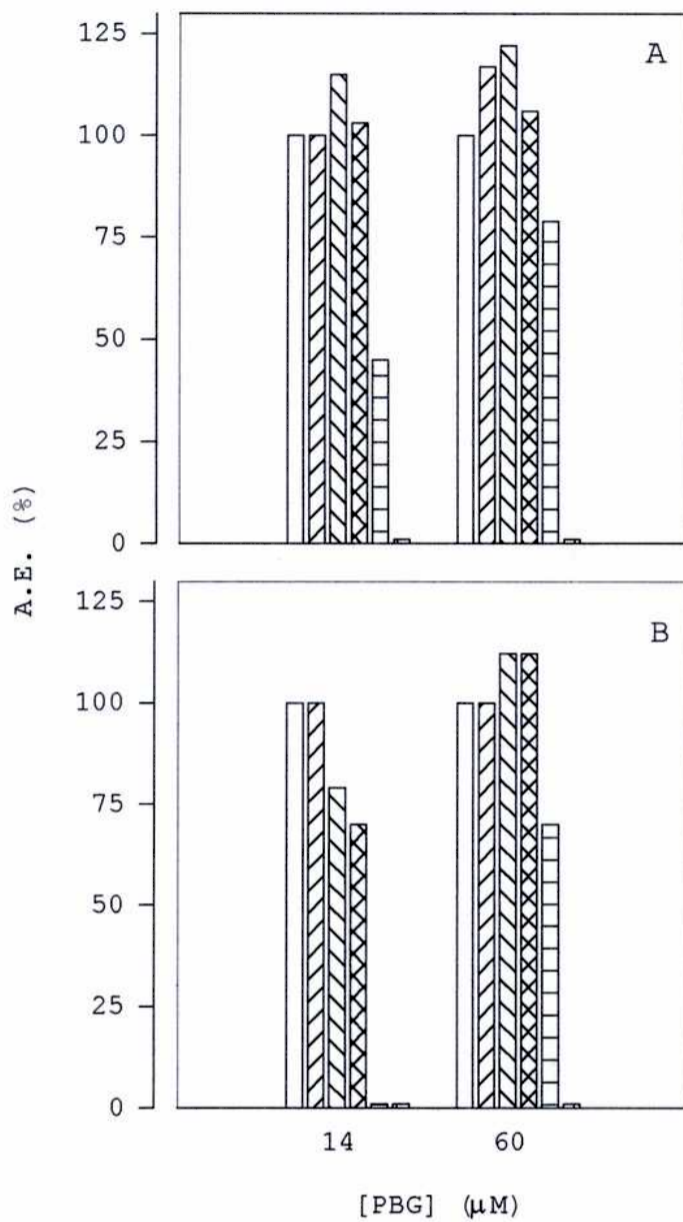


FIGURA R-I.16.: Efecto de distintas concentraciones de ácido fólico sobre la PBG-D de corteza cerebral (A) y de cerebelo (B) de rata. Los datos corresponden al control (\square); 0,025 mM (diagonal lines); 0,05 mM (cross-hatch); 0,10 mM (checkered); 0,50 mM (horizontal lines) y 1,0 mM (vertical lines) de ácido fólico. Se empleó 0,5 ml de fracción enzimática F con una concentración de proteína de 1,478 mg/ml (A) y 1,107 mg/ml (B). El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

I.6. Bibliografía

- Batlle, A. & Rossetti, M.V. (1977) *Int. J. Biochem.*, 8, 251.
- Batlle, A. y Magnin, P. (1988) Porfirias y Porfirinas. Aspectos clínicos y bioquímicos. *Acta Bioquímica Latinoamericana*, 2.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.I.; Gustafson-Potter, K.E.; McDonald, E. & Matcham, G.W. (1982) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 2427.
- Cardalda, C.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1995) *Eur. J. Biochem.*, en preparación.
- Christenson, W.R.; Reddy, V.R. & Piper, W.N. (1986) *Life Sci.*, 38, 1679.
- Eales, L. (1971) *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.*, 17, 120.
- Frydman, R.B. & Feinstein, G. (1974) *Biochim. Biophys. Acta*, 350, 358.
- Frydman, R.B. & Frydman, B. (1970) *Arch. Biochem. Biophys.*, 136, 193.
- Jordan, P.M. & Shemin, D. (1973) *J. Biol. Chem.*, 248, 1019.
- Juknat, A.A.; Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1981) *Int. J. Biochem.*, 13, 343.
- Juknat, A.A.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1988a) *Z. Naturforsch.*, 43C, 351.
- Juknat, A.A.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1988b) *Z. Naturforsch.*, 43C, 357.
- Juknat, A.A.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1994) *Planta*, 193, 123.
- Kohashi, M.; Clement, R.P.; Tse, J. & Piper, W.N. (1984) *Biochem. J.*, 220, 755.
- Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.*, 87B, 601.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A.; Correa García, S.R. & Batlle, A. (1988a) *Med. Sci. Res.*, 16, 323.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A.; Correa García, S.R.; Princ, F.G. & Batlle, A. (1988b) *Med. Sci. Res.*, 16, 983.
- Llambias, E. & Batlle, A. (1971a) *Biochem. J.*, 121, 327.
- Llambias, E. & Batlle, A. (1971b) *Biochim. Biophys. Acta*, 227, 180.
- Noriega, G.O.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1992) *Z. Naturforsch.*, 47C, 416.
- Peters, P.G.; Sharma, M.L.; Hardwicke, D.M. & Piper, W.N. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, 201, 88.
- Piper, W.N. & van Lier, R.B. (1977) *Mol. Pharmacol.*, 13, 1126.
- Piper, W.N. & Tephly, T.R. (1974) *Life Sci.*, 14, 873.
- Piper, W.N. & Tephly, T.R. (1975) *Porphyrins in Human Diseases. Report of Discussions*; Doss, M. & Nawrocki, P. (eds.); Karger, Basel; 128.
- Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1977) *Int. J. Biochem.*, 8, 277.

- Rossetti, M.V.; Araujo, L.S.; Lombardo, M.E.; Correa García, S.R. & Batlle, A. (1987) *Comp. Biochem. Physiol.*, 87B, 593.
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969a) *Biochim. Biophys. Acta*, 191, 130.
- Sancovich, H.; Batlle, A. & Grinstein, M. (1969b) *FEBS Lett.*, 3, 223.
- Smythe, E. & Williams, D.S. (1988) *Biochem. J.*, 251, 237.
- Stein, J.A. & Tschudy, D.P. (1970) *Medicine*, 49, 1.
- Wider, E.A.; Batlle, A.; Stella, A.M. & Malamud, S. (1980) *Int. J. Biochem.*, 12, 819.
- Williams, D.; Morgan, G. McDonald, E. & Battersby, A. (1981) *Biochem. J.*, 193, 301.
- Williams, D. (1984) *Biochem. J.*, 217, 675.

CAPITULO II

ESTUDIOS SOBRE PARTICULADOS DE CEREBELO

	Página
II.1. Captación de ALA y su metabolización a PBG y porfirinas.	
Elección del sistema de estudio.....	123
II.2. Viabilidad celular.....	124
II.2.1. Incorporación de leucina a proteínas.....	124
II.2.2. Captación de glucosa.....	126
II.3. Respuesta del particulado de cerebelo al agregado	
exógeno de ALA.....	128
II.3.1. Curva de proteína.....	128
II.3.2. Curva de sustrato.....	130
II.3.3. Curva de tiempo.....	132
II.3.4. Medición de actividad enzimática en el	
medio de incubación.....	133
II.3.5. Distribución de los metabolitos sintetizados e identificación de las porfirinas	
formadas.....	134
II.4. Estudios sobre la incorporación de ALA.....	136
II.5. Efecto de la sulfamerazina y del ácido fólico.....	140
II.6. Bibliografía.....	143

II. ESTUDIOS SOBRE PARTICULADOS DE CEREBELO

II.1. Captación de ALA y su metabolización a PBG y porfirinas. Elección del sistema de estudio.

Como ya se ha descrito en el ítem I.6.2., de la introducción, en la PAI se observa una sobreproducción hepática de los precursores de la biosíntesis del hemo, ALA y PBG, que son excretados por orina. En 1970, Sweeney et al. encontraron en la orina de un paciente con esta porfiria un valor de 227 mg ALA/día, que representa un aumento de 100 veces con respecto al control normal; estos mismos autores observaron que la concentración de ALA en el fluido cerebroespinal era de 0,28 mg/100 ml y su contenido plasmático de 2,4 mg/100 ml, cifras también muy elevadas.

Como se ha indicado este exceso de ALA se debe a una mayor síntesis y acumulación hepática, pero dada la sintomatología neurológica que presentan estos pacientes (ítem I.6.2., de la introducción) no puede descartarse una sobreproducción y acumulación también en el sistema nervioso. Cabe recordarse que en experiencias realizadas con ratas, se demostró que la barrera hematoencefálica era débilmente permeable al ALA (Mc Gillion et al., 1975; Shanley et al., 1975).

Hasta el momento se han publicado muy pocos estudios acerca de la biosíntesis de porfirinas en cerebro. En los mismos se emplearon homogenatos (Percy & Shanley, 1979; Maines, 1980; Kotler et al., 1988a), cultivos organotípicos (Whetsell, 1978), cultivos de tejido neural primario (Percy et al., 1981; Durko & Juhasz, 1987), cortes de tejidos (Becker et al., 1974), o bajo condiciones *in vivo* la inyección intraventricular de [4-¹⁴C]ALA en ratas (De Matteis & Ray, 1982).

Por otro lado en búsqueda de un sistema para el estudio de la biosíntesis de glicoproteínas en sistema nervioso central

(SNC), Alperin *et al.* (1986) desarrollaron un micrométodo de incubación empleando partículas pequeñas ($\varnothing_{\min} = 50 \mu\text{m}$) de corteza cerebral de rata. Este sistema permitió estudiar la velocidad de incorporación de $[2\text{-}^3\text{H}]$ -manosa a proteínas en presencia de concentraciones fisiológicas de glucosa, manteniendo un flujo constante de precursor radioactivo y niveles de marcación en estado estacionario.

El tamaño del particulado obtenido descarta los fenómenos de difusión de nutrientes que aparecen al incubar cortes de SNC (Pardrige, 1983) y los resultados son altamente reproducibles. Por otro lado la preparación preserva la integridad del tejido nervioso, dado que se mantienen las relaciones topológicas entre las neuronas y las células de la glía. Además la obtención rápida de estos particulados reduce al mínimo los efectos perjudiciales de la falta de O_2 y de glucosa sobre el tejido (Ames & Gurian, 1967).

Sobre esta base, se decidió estudiar la incorporación de ALA y su metabolización a PBG y porfirinas en este modelo de particulado de cerebelo de rata.

II.2. Viabilidad celular

II.2.1. Incorporación de leucina a proteínas

Con el fin de establecer el comportamiento del sistema de particulados durante la incubación, se estudió la incorporación de leucina a proteínas. Se incubaron los particulados de cerebelo (8 mg de proteína) a distintos tiempos hasta 5 h con 5 μCi de $\text{Leu-4,5-}^3\text{H}$ /cavidad en el medio detallado en métodos. Además se investigó el efecto de una concentración final de 1,0 mM de ALA sobre la incorporación de este aminoácido a las proteínas.

Como un control de la disponibilidad del aminoácido marcado durante la incubación, se realizaron las mediciones de leucina tritiada remanente en el medio.

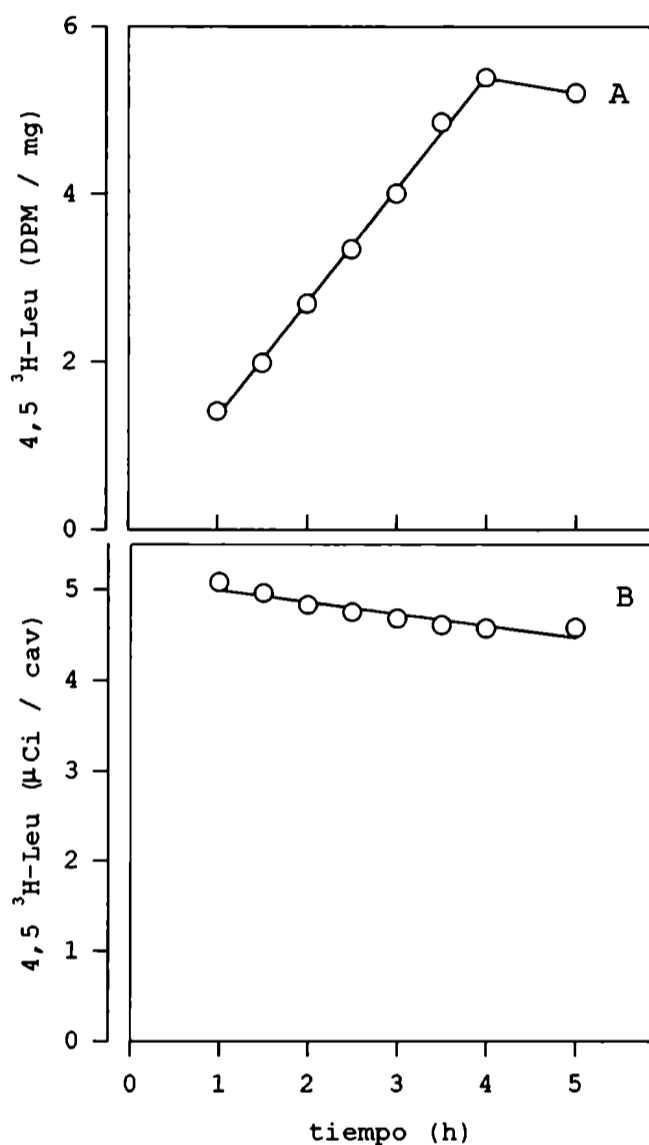


FIGURA R-II.1.: Incorporación de Leu-4,5³H a proteína (A) y precursor radioactivo remanente en el medio (B) en función del tiempo de incubación. La condiciones de incubación, el tratamiento y la medición de las muestras se describen en métodos.

Se observa una incorporación lineal ($r= 0,998$) de leucina a proteína hasta las 4 horas de incubación (Figura R-II.1.A.). Esta linealidad está relacionada con la viabilidad del tejido, ya que la velocidad de incorporación del aminoácido no se modifica durante las horas de incubación.

En la Figura R-II.1.B. se muestra que la desaparición de leucina del medio de incubación disminuye linealmente y muy lentamente ($r= 0,980$) durante los tiempos ensayados. Por lo tanto, la incorporación de Leu- ^3H a la proteína se produjo prácticamente en condiciones tales que hubo oferta casi constante del aminoácido.

La presencia de 1,0 mM de ALA en el medio de incubación no ejerce ningún efecto sobre la incorporación de leucina a proteínas. Dado que los datos correspondientes a este estudio son coincidentes con los ya representados en la Figura R-II.1.A., no se los ha graficado por un problema de claridad.

II.2.2. Captación de glucosa

A diferencia de otros tejidos, bajo condiciones normales, el cerebro depende casi exclusivamente de la glucosa como fuente de energía. Alteraciones en su producción y/o metabolización estarían asociadas a modificaciones en la funcionalidad de las células nerviosas (Sokoloff, 1977).

Por lo tanto tiene importancia evaluar la oferta de glucosa a los particulados de cerebelo considerando distintos aspectos:

- a) Asegurar que durante el período de incubación los niveles de glucosa sean constantes y alcancen concentraciones semejantes a las fisiológicas (1 g/l) o superiores al umbral *in situ* (0,5 g/l), definiéndose umbral fisiológico a los valores mínimos de glucosa compatibles con una función normal del SNC en el animal (Lewis et al., 1974).
- b) Verificar si el consumo de glucosa es lineal durante el tiempo de incubación.
- c) Establecer si existe alguna relación entre el consumo de glucosa por parte del particulado y la presencia de ALA. Este punto será analizado en el capítulo IV.

Para estudiar estos aspectos, se incubó el particulado de cerebelo (7 mg de proteína) a distintos tiempos hasta 5 h, en presencia de una concentración fisiológica de glucosa (1 g/l) siguiendo la técnica descrita en métodos.

La Figura R-II.2. muestra la desaparición de glucosa que se determinó midiendo la cantidad remanente en el medio luego de finalizada la incubación. Se observa que la misma es lineal con el tiempo, hasta las 5 h ensayadas ($r= 0,982$).

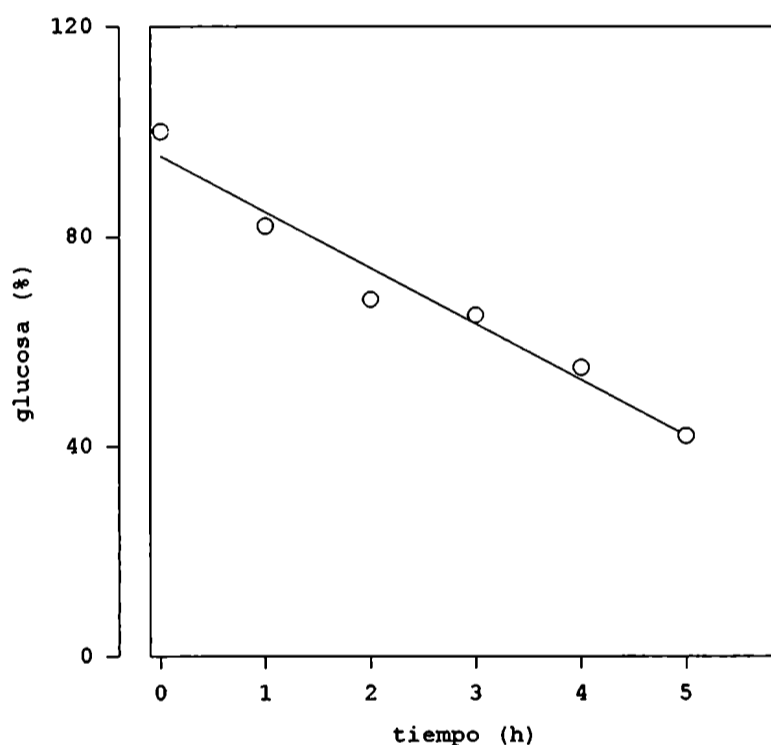


FIGURA R-II.2.: Glucosa remanente en el medio de incubación. Los valores son expresados como porcentaje de los controles. Las condiciones experimentales se detallan en métodos.

Por otra parte se determinó la cantidad de glucosa captada en función del tiempo de incubación hasta las 4 h. Esta se calculó como la diferencia en la cantidad de glucosa entre la existente el medio con y sin particulado luego de la incubación, del mismo modo se realizaron los cálculos cuando se incubó en presencia de ALA.

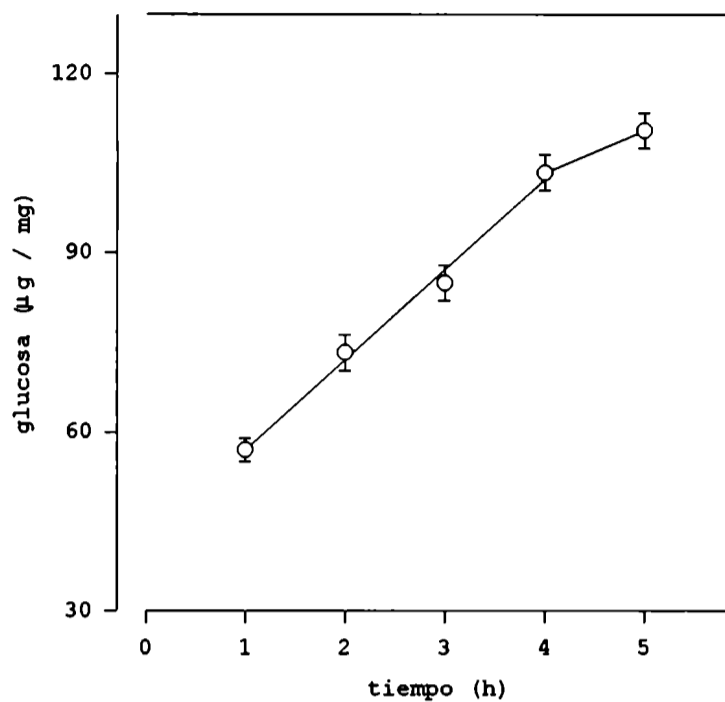


FIGURA R-II.3.: Captación de glucosa por el particulado de cerebelo (7 mg de proteína) en función del tiempo de incubación. Las condiciones de incubación como las determinaciones se detallan en métodos.

Los datos obtenidos (Figura R-II.3.) muestran que hay correspondencia lineal ($r= 0,985$) entre la cantidad captada de glucosa y el tiempo de incubación, hasta las 4 h.

En conclusión, se observa que la desaparición de glucosa del medio es lineal con el tiempo de incubación alcanzando el umbral *in situ* a las 4 h (Figura R-II.2.), estimándose así que, en estas condiciones, este modelo de estudio permite mantener la capacidad funcional de las células durante los tiempos empleados en las distintas experiencias.

II.3. Respuesta del particulado de cerebelo al agregado exógeno de ALA

II.3.1. Curva de proteína

Se estudió el efecto de la concentración proteica sobre la incorporación de ALA y su metabolización, para ello se incubó el

particulado de cerebelo de rata con cantidades crecientes de proteína durante 4 horas en presencia de una concentración final de 4,0 mM de ALA. Los resultados obtenidos para el ALA remanente en el medio y su incorporación en el particulado, para la biosíntesis de PBG y la formación de porfirinas se observan en las Figuras R-II.4.A., R-II.4.B. y R-II.4.C., respectivamente.

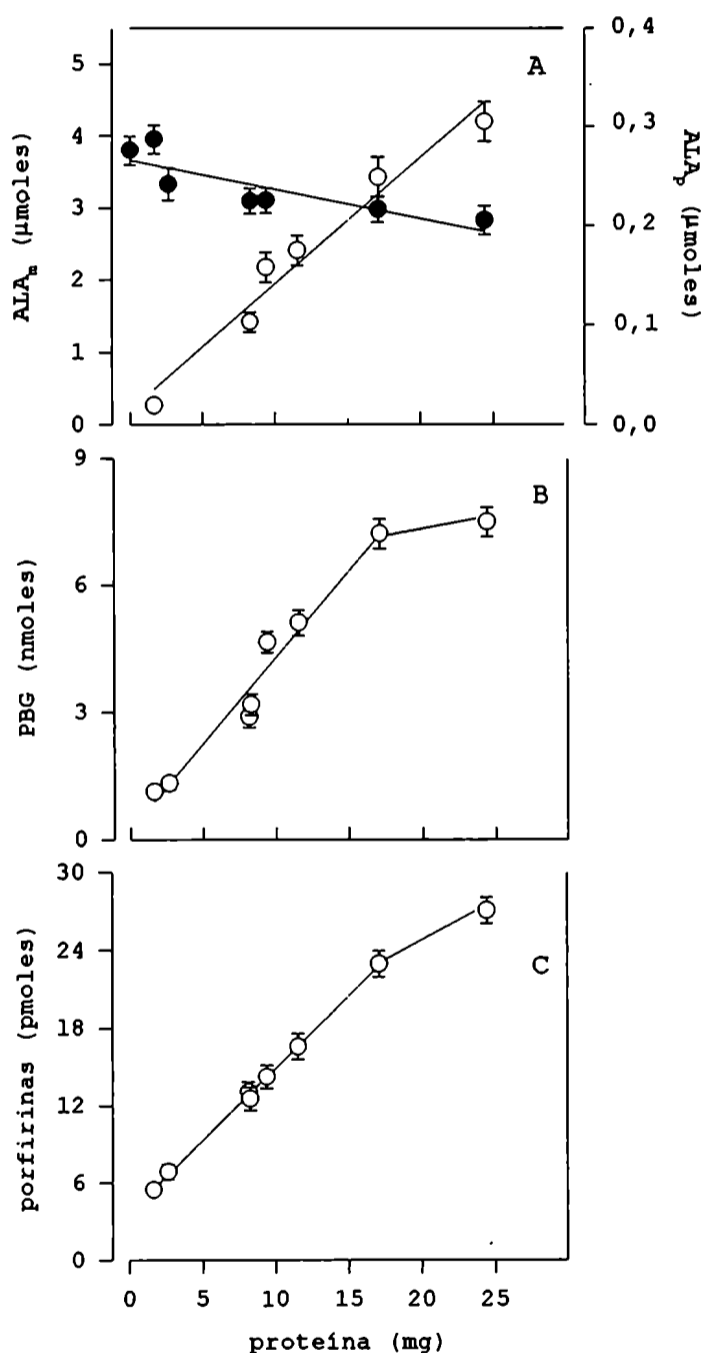


FIGURA R-II.4.: ALA remanente en el medio de incubación (ALA_m) (●) y ALA incorporado en el particulado (ALA_p) (○) (A), biosíntesis de PBG (B) y formación de porfirinas (C) en función de la cantidad de proteína. Las condiciones del ensayo y las determinaciones de los precursores y de las porfirinas se detallan en métodos.

La Figura R-II.4.A. muestra la desaparición de ALA medida como la cantidad remanente en el medio luego de finalizada la incubación. Empleando 25 mg de proteína la captación de ALA es del 25% respecto a la cantidad existente al inicio del ensayo. Además, se observa que la incorporación de ALA en el particulado aumenta hasta 25 mg de proteína ($r= 0,930$) mientras que la correspondiente a la biosíntesis de PBG ($r= 0,950$) (Figura R-II.4.B.) y la formación de porfirinas ($r= 0,978$) (Figura R-II.4.C.) presentan un aumento lineal en el rango de 2,5 a 17 mg.

De acuerdo con estos resultados se empleará una cantidad de proteína por cavidad de 8 a 12 mg para los experimentos de particulado.

II.3.2. Curva de sustrato

Para establecer los efectos de la concentración de ALA sobre su propia captación se incubó el sistema con concentraciones finales variables de ALA (0,01 - 4,0 mM).

Se observó un incremento lineal en la acumulación de ALA en las células hasta una concentración de 4,0 mM (Figura R-II.5.A.), mientras que la biosíntesis de PBG (Figura R-II.5.B.) alcanzó un máximo a 1,0 mM de ALA seguido de una caída de un 20% a 4,0 mM del sustrato. La formación de porfirinas (Figura R-II.5.C.) mostró una respuesta hiperbólica alcanzando un plateau a 1,5 mM de ALA.

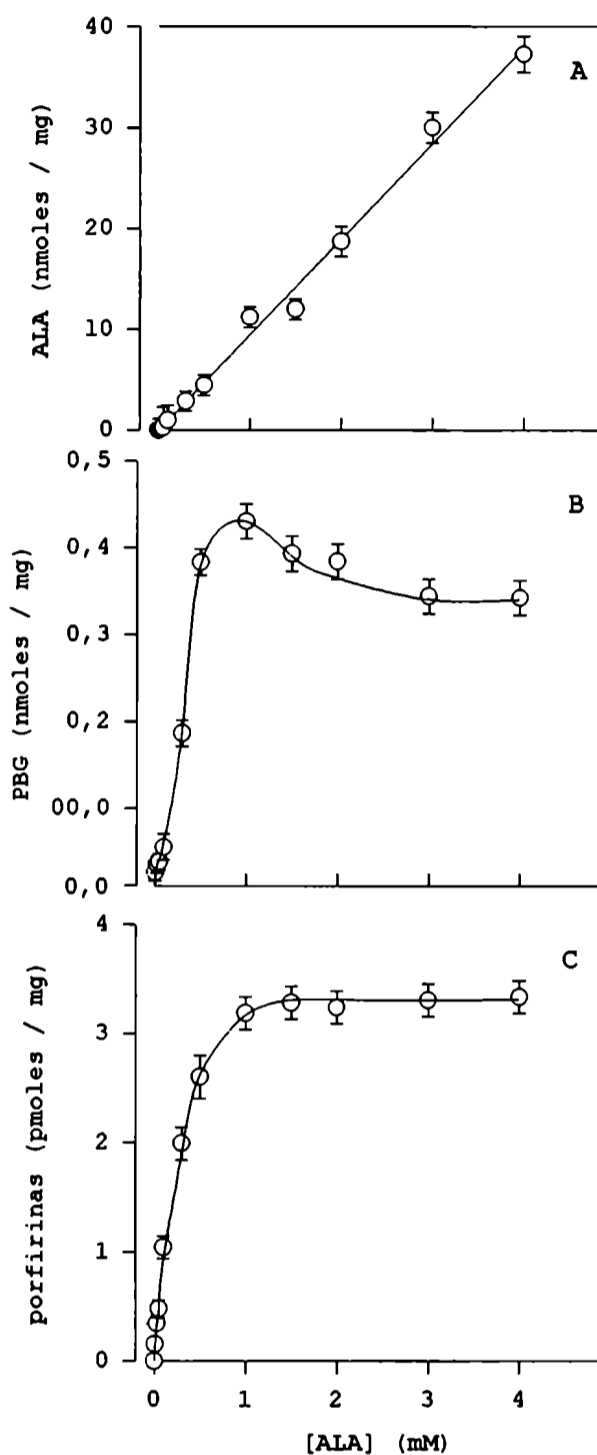


FIGURA R-II.5.: Acumulación de ALA (A), biosíntesis de PBG (B) y formación de porfirinas (C) en función de la concentración de ALA durante 4 horas de incubación empleando 8 mg de proteína. El resto de las condiciones del ensayo y las determinaciones se detallan en métodos.

En la Figura R-II.5.A. se observa que la concentración de ALA en el particulado de cerebelo aumenta linealmente ($r= 0,942$) y puede alcanzar, bajo ciertas condiciones, valores de $1,8 \pm 0,5$ nmoles/mg luego de 4 h de incubación en presencia de 0,2 mM final de ALA. Este dato es del mismo orden al encontrado en hígado

(234 $\mu\text{g/g}$ de hígado seco o 1,77 nmoles/mg de hígado seco) por Sweeney et al. (1970) durante un ataque agudo de PAI.

Por otro lado, en el mismo gráfico se muestra que el cerebelo puede captar cantidades elevadas de ALA alcanzando una concentración de $38,0 \pm 1,5$ nmoles/mg, valor que excede la capacidad del ALA-D, según puede observarse en la Figura R-II.5.B. Más aún, estos datos indican que el ALA puede acumularse y concentrarse en el cerebelo, alcanzando niveles que pueden ser más altos que los medidos en el fluido cerebroespinal.

La máxima síntesis fue de $0,45 \pm 0,03$ nmoles/mg para el PBG (Figura R-II.5.B.) y de $3,25 \pm 0,16$ pmoles/mg para las porfirinas (Figura R-II.5.C.) luego de 4 h de incubación. Esta actividad muy baja de la PBG-D está de acuerdo con la hipótesis que propone que, bajo ciertas circunstancias, esta enzima constituye un paso de control secundario en la biosíntesis del hemo (Elder, 1976). En incubaciones empleando homogenatos de cerebelo de rata, Maines (1980) encontró que la formación de PBG alcanzaba 0,70 nmoles/mg.h y la de porfirinas 2,45 pmoles/mg. En este trabajo se ha medido una actividad de PBG-D de 11 pmoles/mg h (Tabla R-I.4.) en homogenato de cerebelo.

II.3.3. Curva de tiempo

Para estudiar los parámetros en función del tiempo se realizaron incubaciones del sistema de particulados de cerebelo hasta 4 horas.

La desaparición de ALA del medio fue exponencial (Figura R-II.6.A.) alcanzando el 58 % del valor inicial después de 4 h. En cambio la acumulación de ALA ($r= 0,966$) (Figura R-II.6.A.), la síntesis de PBG ($r= 0,980$) (Figura R-II.6.B.) y la formación de porfirinas ($r= 0,980$) (Figura R-II.6.C.) mostraron un incremento lineal a lo largo de las 4 h de incubación.

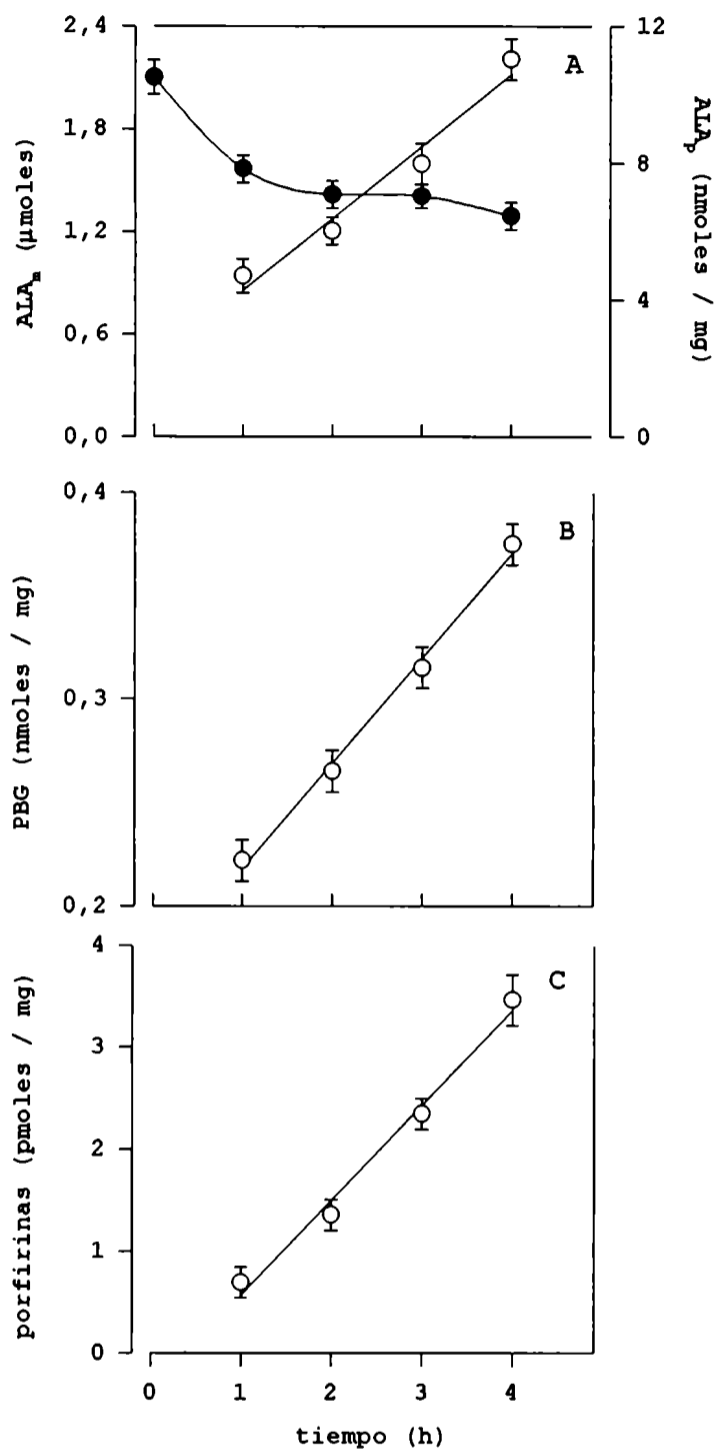


FIGURA R-II.6.: Acumulación de ALA en el particulado (ALA_p) (○) y ALA remanente en el medio (ALA_m) (●) (A), biosíntesis de PBG (B) y formación de porfirinas (C) en función del tiempo. Las condiciones de incubación y las determinaciones se indican en métodos.

II.3.4. Medición de actividad enzimática en el medio de incubación

Para determinar si hubo liberación de enzimas al medio durante la incubación del particulado, se midió la actividad de ALA-D (item II.2.2., de métodos) y de PBG-D (item II.2.1., de métodos) en el medio obtenido, luego de incubar el particulado de

cerebelo (particulado + medio, sin ALA) a distintos tiempos. Los datos se encuentran en la Tabla R-II.1., no observándose diferencias significativas entre los incubados para ambas enzimas.

TABLA R-II.1.: Actividades de ALA-D y PBG-D en el medio de incubación del particulado

Tiempo de incubación (h)	ALA-D (nmoles)		PBG-D (pmoles)	
	M	M + ALA	M	M + PBG
1	2,31	2,36	9,23	9,31
2	1,93	1,90	9,13	9,20
3	2,15	2,19	9,23	9,10
4	2,06	2,10	9,40	9,40

M= Medio proveniente de la incubación del particulado de cerebelo incubado a distintos tiempos como control.

M + ALA= Medio incubado con sustrato ALA

M + PBG= Medio incubado con sustrato PBG

Se puede concluir que no hay liberación al medio de enzimas capaces de metabolizar ALA y PBG, durante la incubación. Esto está indicando que el procedimiento de separación de los restos celulares, durante la preparación de los particulados ha sido eficiente, y además habla de la integridad de la membrana celular.

II.3.5. Distribución de los metabolitos sintetizados e identificación de las porfirinas formadas

En estudios realizados en nuestro laboratorio se observó que, durante incubaciones del sistema de particulados de corteza cerebral, existe liberación de PBG y porfirinas al medio (Juknat et al., 1995). De acuerdo con estas evidencias se resolvió medir,

en cada experiencia, el contenido de ambos metabolitos presentes en el medio luego de finalizada la incubación.

En la Figura R-II.7. se muestra, como ejemplo, los datos correspondientes a una curva de tiempo en la que se observó un aumento en la liberación de PBG (Figura R-II.7.A.) hasta las 4 h estudiadas. Con respecto a las porfirinas también hubo un incremento en su liberación con el tiempo de incubación (Figura R-II.7.B.).

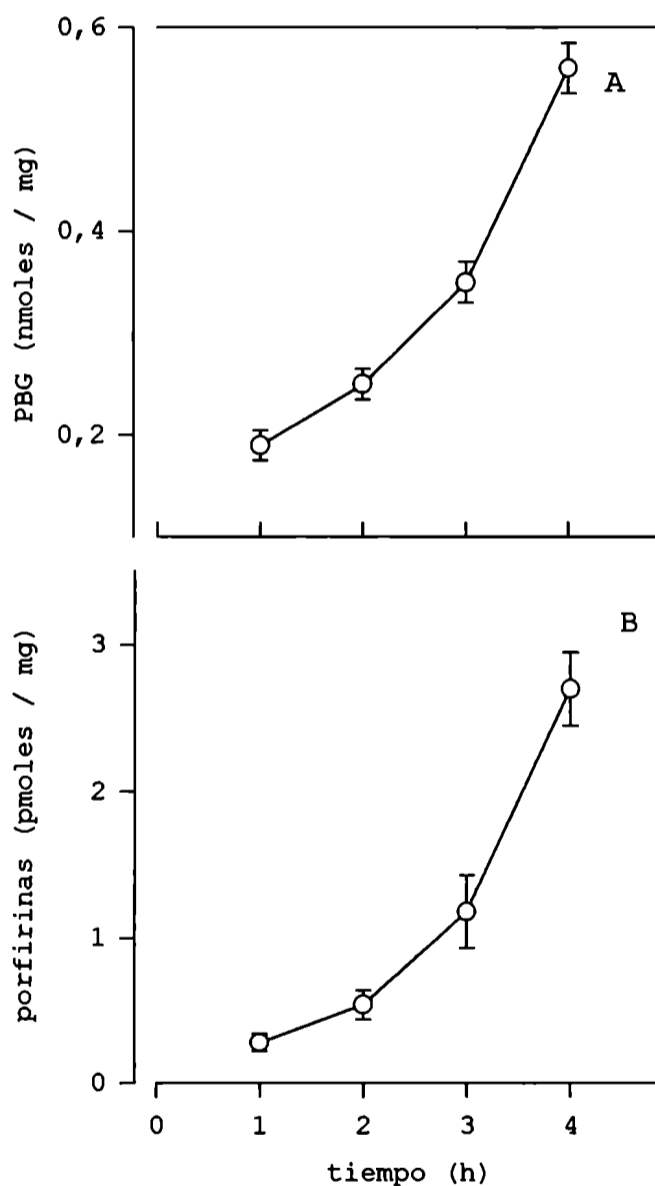


FIGURA R-II.7.: Liberación de PBG (A) y porfirinas (B) al medio de incubación en función del tiempo. El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

Los resultados indicaron que hay más cantidad de PBG en el medio (60 - 65%, respecto al total sintetizado) que en el

particulado. En cambio, el análisis de la distribución de las porfirinas entre las células y el medio, demostró que el 56% del total de las mismas se encuentra en el particulado.

La identificación de las porfirinas formadas se realizó por HPLC y permitió determinar la presencia de coproporfirina y protoporfirina tanto en el medio como en el particulado en similares relaciones (Tabla R-II.2.).

TABLA R-II.2.: Identificación de las porfirinas

Tipo de Porphirina	Particulado (%)	Medio (%)
Coproporfirina	64	60
Protoporfirina	36	40

Distribución de porfirinas en el medio y en el particulado obtenida por cromatografía por HPLC. La determinación se detalla en métodos.

Comparando con los datos obtenidos en las incubaciones de homogenato y sobrenadante de cerebelo de rata (Figuras R-I.1. y R-I.2.) se observa que en el sistema de particulados las actividades enzimáticas del camino biosintético de las porfirinas se encuentra en pleno funcionamiento, dado que se sintetiza protoporfirina a partir de incubaciones con ALA como sustrato.

II.4. Estudios sobre la incorporación de ALA

Para determinar si la incorporación de ALA a las células del particulado es un proceso dependiente de energía, se realizaron incubaciones durante 4 h empleando concentraciones variables de ouabaina (OUA) (10^{-7} - 10^{-3} M), un inhibidor de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, en presencia de 1,0 mM de ALA.

En la Figura R-II.8.A. se muestra el efecto inhibitorio de la OUA sobre la incorporación de ALA que alcanza un 50% a 10^{-3} M de OUA (Figura R-II.8.B.).

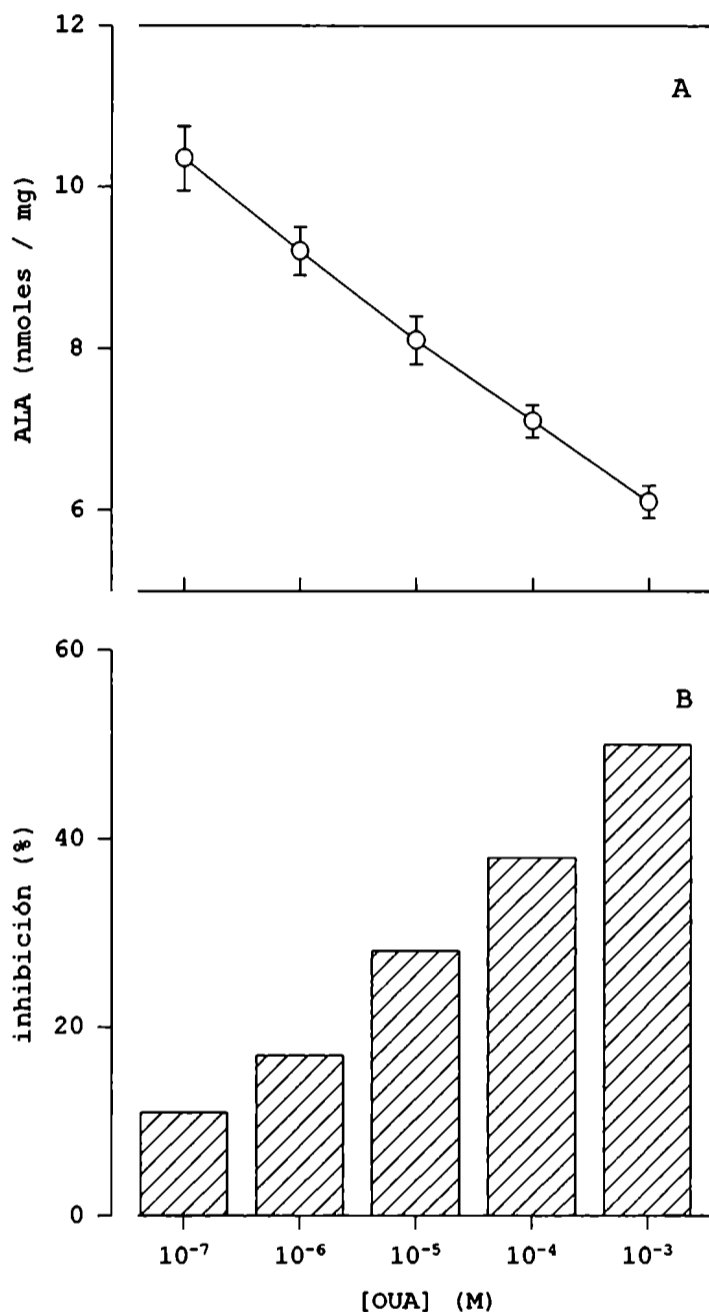


FIGURA R-II.8.: Efecto de la concentración de ouabaina sobre la incorporación de ALA (A) a las células del particulado de cerebelo y el grado de inhibición (B) cuando se incubó durante 4 hs en presencia de 1,0 mM de ALA. Los porcentajes se calcularon respecto al control de ALA sin OUA (11,7 nmoles / .mg).

Además se estudió el efecto de la OUA sobre la incorporación de ALA en función del tiempo. Para esto se empleó la concentración de OUA que produjo mayor inhibición (10^{-3} M) incubándose hasta 4 hs en presencia de 1,0 mM de ALA.

En la Figura R-II.9.A. se observa que la OUA inhibe la incorporación de ALA alcanzando un 45% a 4 h de incubación (Figura R-II.10.) con respecto al control, sin OUA. Esta disminución se ve reflejada tanto en la biosíntesis de PBG (26%) (Figura R-II.9.B.), como en la formación de porfirinas (38%) (Figura R-II.9.C.).

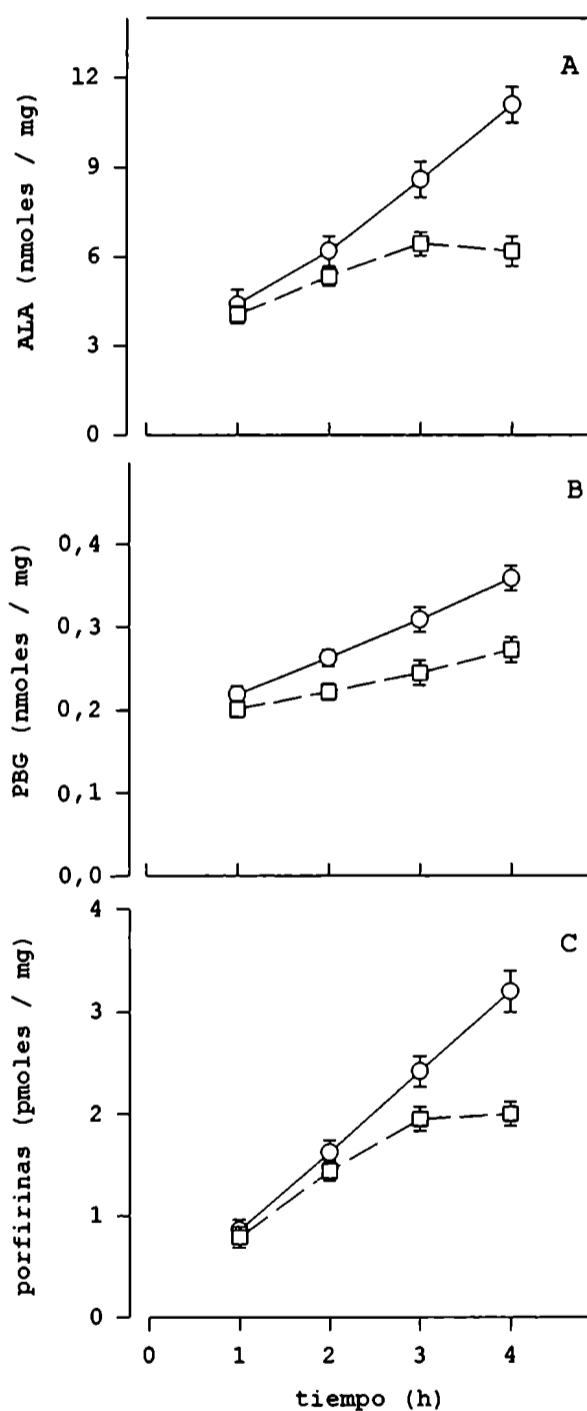


FIGURA R-II.9.: Captación de ALA (A), biosíntesis de PBG (B) y de porfirinas (C) en particulados de cerebelo incubados sin (○) o con (□) OUA en función del tiempo. El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

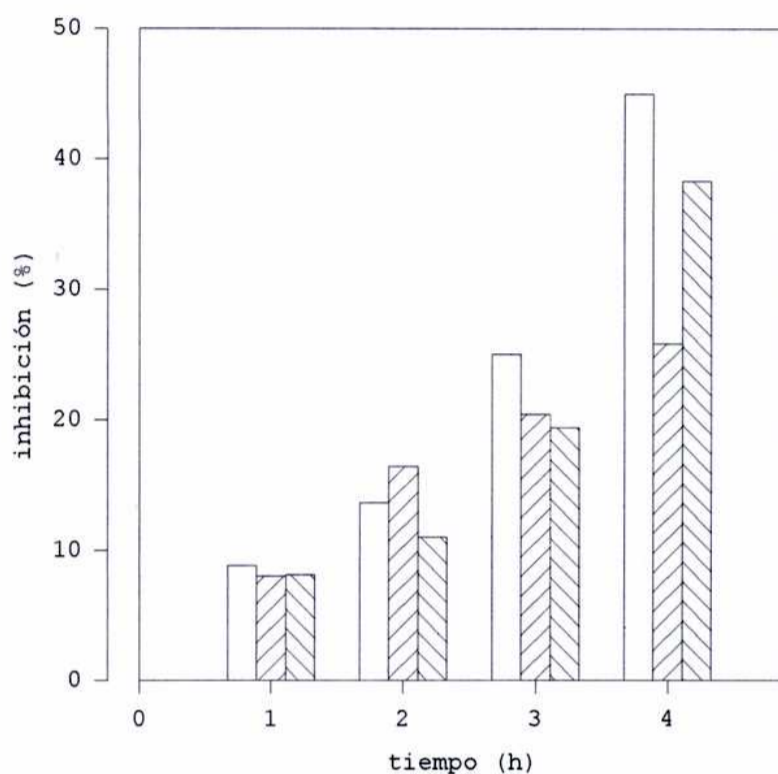


FIGURA R-II.10.: Efecto de la ouabaina (10^{-3} M) sobre la captación de ALA (□), biosíntesis de PBG (▨) y formación de porfirinas (▩) en particulados de cerebelo en función del tiempo. Los porcentajes son calculados con respecto al control sin OUA.

Estos resultados están de acuerdo con los hallados por Becker *et al.* (1974) quienes encontraron una reducción del consumo de ALA del 62% en presencia de 0,05 mM de ouabaina en incubaciones de cortes de cerebro de conejo. Por otra parte Russell *et al.* (1983) midieron la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa y observaron que el agregado de 1,0 mM de ALA produjo una inhibición del 77% en cultivos de neuronas de embrión de pollo de 7 días.

Sin embargo, Percy *et al.* (1981) no hallaron efecto alguno por parte de la ouabaina (1,0 mM) en la captación de ALA en incubaciones de cultivos celulares de neuronas y gliales de embrión de pollo, sugiriendo que en este caso la incorporación de ALA ocurriría por un mecanismo de difusión.

II.5. Efecto de la sulfamerazina y del ácido fólico

Según lo detallado en el ítem I.5. de resultados, fue de nuestro interés estudiar el efecto de la SMZ y del ácido fólico en el sistema de particulados de cerebelo de rata. Se realizaron incubaciones durante 4 hs como se indica en métodos empleando concentraciones finales variables de SMZ (0,1 - 1,0 mM) en presencia de ALA 1,0 mM.

Se observó un efecto inhibitorio para todas las concentraciones ensayadas alcanzándose un 40 % a partir de 0,3 mM de SMZ (Figura R-II.11.).

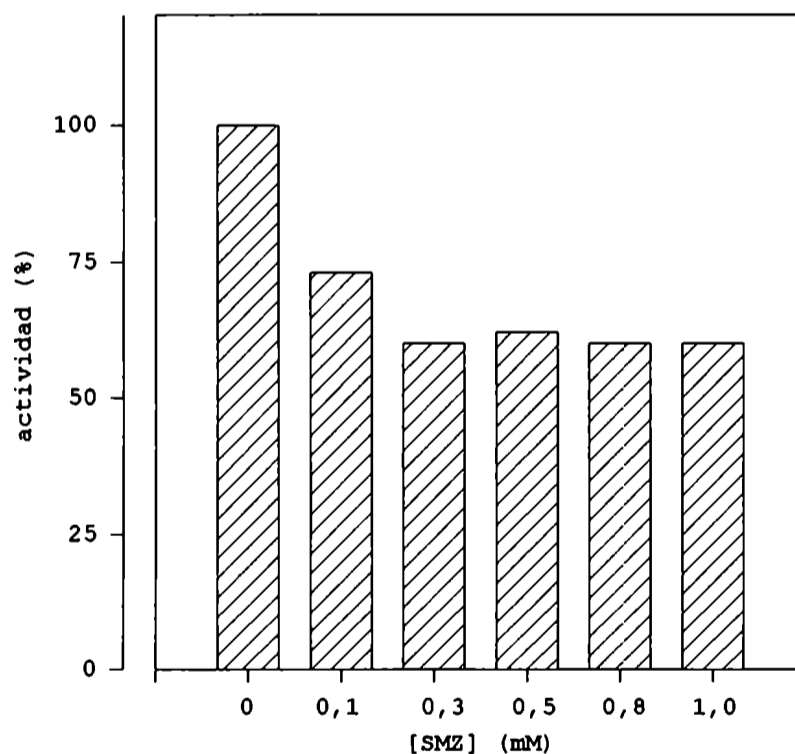


FIGURA R-II.11.: Efecto de distintas concentraciones de SMZ sobre la formación de porfirinas en particulados de cerebelo de rata incubado con 1,0 mM de ALA durante 4 h. Los datos corresponden a porcentajes con respecto al control incubado sin SMZ.

Estos resultados están de acuerdo con nuestros datos aquí presentados para la PBG-D de cerebelo (ítem I.5. de resultados) donde se obtuvo una inhibición del 43% para 0,3 mM de SMZ y 14 μ M

de PBG y con los publicados por Peters et al. (1980) y Kotler et al. (1988a, b) para esta enzima de hígado y sangre de rata respectivamente.

Por otra parte, se investigó el efecto del ácido fólico (0 - 0,5 mM) en presencia de 1,0 mM de ALA. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura R-II.12. Se alcanza una activación no muy grande pero significativa (10%) ($p < 0,005$) para las concentraciones más bajas del efector (0,025 mM) y una inhibición que llega al 34% a 0,5 mM de ácido fólico. Aparece nuevamente el efecto dual ya descrito para la PBG-D de cerebelo (item I.5. de resultados) donde la activación fue de un 12% ($p < 0,005$) para 0,05 mM de ácido fólico y la inhibición de un 30% para 0,5 mM en incubaciones con concentraciones saturantes de PBG (60 μM).

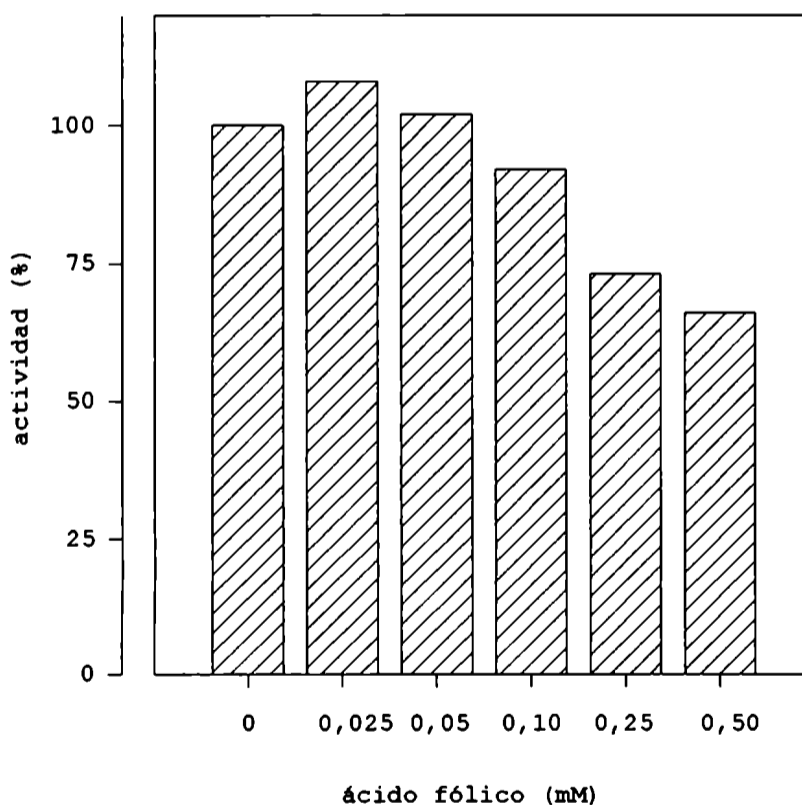


FIGURA R-II.12.: Efecto de distintas concentraciones de ácido fólico sobre la formación de porfirinas en el sistema de particulados de cerebelo. Se consideran los porcentajes con respecto al control incubado sin ácido fólico.

Como ya se destacó en el ítem de resultados estos efectos inhibitorios ejercidos por el ácido fólico fueron novedosos constituyen un punto de interés para futuros estudios

II.6. Bibliografía

- Alperin, D.M.; Idoyaga-Vargas, V.P. & Carminatti, H. (1986) *J. Neurochem.*, 47, 355.
- Ames, A. & Gurian, B.S. (1967) *J. Neurophysiol.*, 26, 617.
- Becker, D.M.; Kramer, S. & Viljoen, J.D. (1974) *J. Neurochem.*, 23, 1019.
- De Matteis, F. & Ray, D.E. (1982) *J. Neurochem.*, 39, 551.
- Durko, I. & Juhasz, A. (1987) *Neurochem. Res.*, 12, 465.
- Elder, G.H. (1976) *Essays Med. Biochem.*, 2, 75.
- Juknat, A.A.; Kotler, M.L. & Batlle, A. (1995) *Comp. Biochem. Physiol.*, en prensa.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A.; Correa García, S.R. & Batlle, A. (1988a) *Med. Sci. Res.*, 16, 323.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A.; Correa García, S.R.; Princ, F.G. & Batlle, A. (1988b) *Med. Sci. Res.*, 16, 823.
- Lewis, L.D.; Ljunggren, B.; Norberg, K. & Siesjö, B.K. (1974) *J. Neurochem.*, 23, 659.
- Maines, M. (1980) *Biochem. J.*, 190, 315.
- Mc Gillion, F.B.; Thompson, G.G. & Goldberg, A. (1975) *Biochem. Pharmacol.*, 24, 299.
- Pardrige, W.M. (1983) *Physiol Rev.*, 63, 1481.
- Percy, V.A. & Shanley, B.C. (1979) *J. Neurochem.*, 33, 126.
- Percy, V.A.; Lamm, M.C. & Taljaard, J.J. (1981) *J. Neurochem.*, 36, 69.
- Peters, P.G.; Sharma, M.L.; Hardwicke, D.M. & Piper, W.N. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, 201, 88.
- Russell, V.A., Lamm, M.C. & Taljaard, J.J. (1983) *Neurochem. Res.*, 8, 1407.
- Shanley, B.C.; Neethling, A.C.; Percy, V.A. & Carstens, M. (1975) *S. Afr. Med. J.*, 49, 576.
- Sokoloff, L (1977) *J. Neurochem.*, 29, 13.
- Sweeney, V.P.; Pathak, M.A. & Asbury, A.K. (1970) *Brain*, 93, 369.
- Whetsell, W.O., Sassa, S., Bickers, D. & Kappas, A. (1978) *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 37, 497.

CAPITULO III

EFFECTO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO SOBRE LA PORFIRINOGENESIS

	Página
III.1. Introducción.....	145
III.2. Marcadores de daño celular.....	148
III.2.1. Medición de los dienos conjugados y TBARS.....	149
III.3. Efecto del anión superóxido.....	154
III.4. Efecto del peróxido de hidrógeno.....	159
III.5. Efecto del radical hidroxilo.....	164
III.6. Bibliografía.....	170

III. EFECTO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO SOBRE LA PORFIRINOGENESIS

III.1. Introducción

Los radicales libres son compuestos altamente reactivos que participan de numerosos procesos biológicos, pero también están comprometidos en diversas patologías. Son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en su órbita externa pudiendo existir en forma independiente. Tienen gran capacidad de aceptar o ceder rápidamente electrones desde o hacia otros compuestos radicales o no, comenzando una reacción en cadena.

Como ya se ha descrito, pueden generarse dentro o fuera de la célula, siendo capaces de producir un daño reversible o irreversible en compuestos tan diversos como ácidos nucleicos, proteínas y aminoácidos libres, lípidos y lipoproteínas e hidratos de carbono.

Entre los radicales libres se encuentran las especies reactivas de oxígeno (ROS): los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (OH^{\cdot}) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) que están presentes en todos los organismos aeróbicos (Fridovich, 1978; Halliwell & Gutteridge, 1986).

El oxígeno (O_2) es una molécula que puede reaccionar con una gran variedad de compuestos químicos y moléculas, aunque su velocidad de reacción, en condiciones normales, es muy lenta. La causa de la débil reactividad química del O_2 es su configuración electrónica. Los átomos y moléculas completan sus órbitas con pares de electrones estabilizados por spins opuestos. El O_2 es un radical doble, porque dos de sus electrones de valencia, los que compartirá en los enlaces con otros átomos o moléculas, se encuentran en órbitas diferentes y tienen spins paralelos, con lo cual están desapareados (Figura R-III.1.).

Cuando el O_2 reacciona con otras moléculas recibe un par de electrones con spins opuestos, debido a la disposición de los spins del oxígeno necesita de la inversión de uno de ellos para poder completar su orbital externo. Esta restricción a la transferencia de electrones es la causa por la cual el O_2 es una molécula poco reactiva (Halliwell & Gutteridge, 1984). La reactividad química puede incrementarse por reducción o excitación (Figura R-III.1.). El oxígeno se reduce a agua cuando acepta cuatro electrones.

Durante este proceso, en el cual intervienen distintas enzimas y metales de transición como el hierro y el cobre, se producen especies intermedias altamente reactivas, como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} .

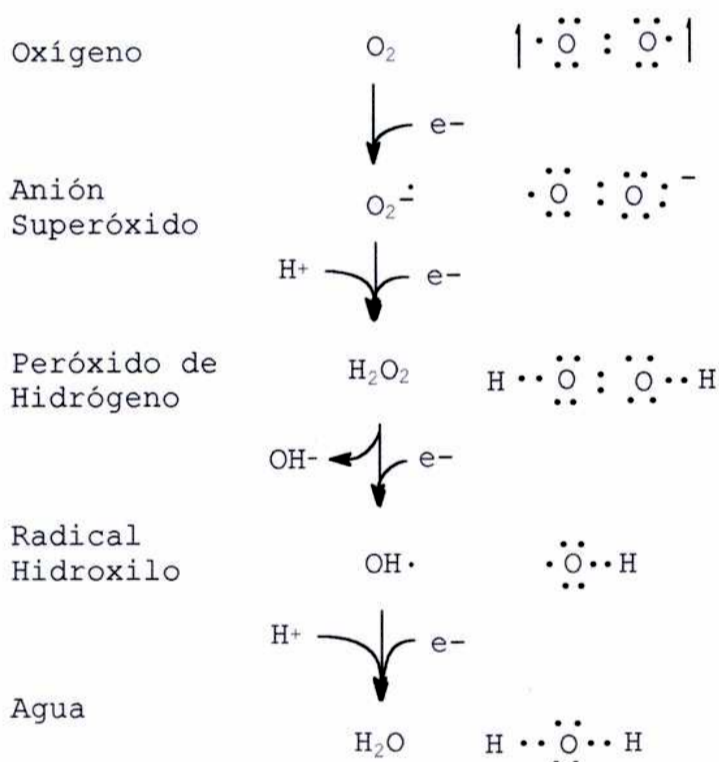


FIGURA R-III.1.: Cadena de reducción del oxígeno. Los electrones se representan con puntos (·) y las flechas indican el sentido de giro del spin.

La producción de ROS por acción de prooxidantes está equilibrada por la existencia de agentes antioxidantes o de secuestrantes ("scavengers") que los metabolizan. El mantenimiento de la homeostasis requiere de un nivel adecuado del equilibrio pro / antioxidante, en caso contrario se generarían

lesiones por estrés oxidativo que conducirían a trastornos fisiopatológicos importantes.

Los antioxidantes pueden ser endógenos: catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px), glutatión (GS); exógenos: vitaminas E y C, β -carotenos o de naturaleza no fisiológica: manitol, dimetilsulfóxido (DMSO).

El cerebro genera continuamente cantidades importantes de radicales libres como resultado de la actividad oxidativa de la mitocondria y del catabolismo de las catecolaminas, al mismo tiempo contiene altos niveles de ácidos grasos poliinsaturados, los blancos preferidos de estas especies reactivas produciendo daño celular con el agravante que en el sistema nervioso central de los mamíferos la actividad de las enzimas secuestrantes de ROS son bajas comparadas con la de otros órganos (Perez-Campo et al., 1993).

Por otra parte, como ya se mencionó en la introducción, los pacientes con Porfiria Aguda Intermitente (PAI) presentan un cuadro bioquímico caracterizado por altas concentraciones de ALA y PBG en hígado, sangre y orina, y clínicamente manifiestan una sintomatología predominantemente neurológica. La etiología de esta enfermedad no está aún aclarada pero la capacidad que tiene el ALA de generar, por autooxidación, ROS y los efectos que estos pueden causar en distintas funciones celulares permiten plantear una hipótesis al respecto.

Distintos autores han propuesto que la presencia de ALA está relacionada con diversas alteraciones celulares, como el daño en la mitocondria de hígado (Hermes-Lima et al., 1991), las disfunciones del metabolismo oxidativo en ratas sedentarias y entrenadas (Pereira et al., 1992), la acción tóxica del ALA sobre líneas celulares de neuro y glioblastoma humano (Helson et al., 1993), la ruptura de la simple cadena del plásmido pBR322 (Onuki et al., 1994) y la formación de residuos 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina sobre el ADN (Fraga et al., 1994).

Por todo lo expuesto y para determinar el compromiso de las especies reactivas de oxígeno generadas por autooxidación del ALA en la patogénesis de la PAI se decidió estudiar el efecto de secuestrantes de ROS sobre la porfirinogénesis como así también sobre la formación de productos de la lipoperoxidación.

III.2. Marcadores de daño celular

Las células aeróbicas están constantemente expuestas a los efectos potencialmente dañinos de oxidantes. Uno de los ejemplos más importantes es la lipoperoxidación, término que se refiere a la degradación oxidativa de fosfolípidos, colesterol y otros lípidos insaturados, con la consecuente formación y ruptura de los lipohidroperóxidos.

Todo este proceso produce daño estructural y funcional de las membranas celulares observándose un incremento de la permeabilidad iónica, pérdida de la fluidez, cross-linking de aminolípidos con polipéptidos y la inactivación de receptores y proteínas de membrana. Esta disfunción está asociada a diversas patologías (Logani & Davies, 1980; Kappus, 1985; Girotti, 1985) y diferentes agentes enzimáticos y no enzimáticos pueden inducir la lipoperoxidación de sistemas biológicos (Girotti, 1985), como por ejemplo: oxidasas, NADPH-citocromo P₄₅₀ reductasa, radiación ionizante, hierro (II), reacciones que generen ozono, etc.

Como ya se ha descrito en la introducción, existen ciertos marcadores de daño celular como los indicadores de lipoperoxidación o de actividad enzimática. Dentro de los primeros los más empleados, se encuentran la determinación de las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la formación de dienos conjugados en los lípidos de membrana.

La determinación de los TBARS es muy conveniente por su simplicidad y alta sensibilidad; compromete a lípidos peroxidados que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando los

cromógenos malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal y otros productos con carbonilos generados durante la oxidación lipídica.

Los TBARS se producen durante la reacción de propagación por ciclación del radical intermediario peroxilo y la escisión de la cadena siendo considerados como el producto final de la peroxidación. Los antioxidantes inhiben esta reacción donando un hidrógeno al lipoperóxido.

El reacomodamiento de hidroperóxidos obtenidos por reacción de un lípido insaturado con oxígeno produce dienos conjugados (Dahle et al., 1962) y su cuantificación implica la extracción en fase orgánica del ambiente lipídico.

III.2.1. Medición de los dienos conjugados y TBARS

El cerebro es el órgano que muestra los niveles más altos de peroxidación tisular siendo los datos de TBARS muy diferentes en relación con los obtenidos en otros órganos (Lopez-Torres et al., 1993). Estos valores tan altos se atribuyen a la presencia simultánea de concentraciones elevadas de ácidos grasos poliinsaturados y de hierro (Halliwell & Gutteridge, 1989).

Por lo descripto, se decidió evaluar la formación de dienos conjugados en el particulado de cerebelo de rata empleando una concentración final de 1,0 mM de ALA, como sistema generador de ROS, durante 4 h de incubación. En las condiciones de ensayo se obtuvo un aumento del 50% en la formación de este indicador, con respecto a los controles incubados sin ALA.

Además se determinó la formación de TBARS en el particulado de cerebelo cuando se incubó con concentraciones finales variables de ALA (1,0 - 4,0 mM) a distintos tiempos hasta 4 h.

En la Figura R-III.2. se muestra un incremento en la formación de TBARS en presencia de 1,0 mM de ALA con el tiempo de incubación alcanzando un 72% a las 4h, con respecto a los controles incubados sin ALA.

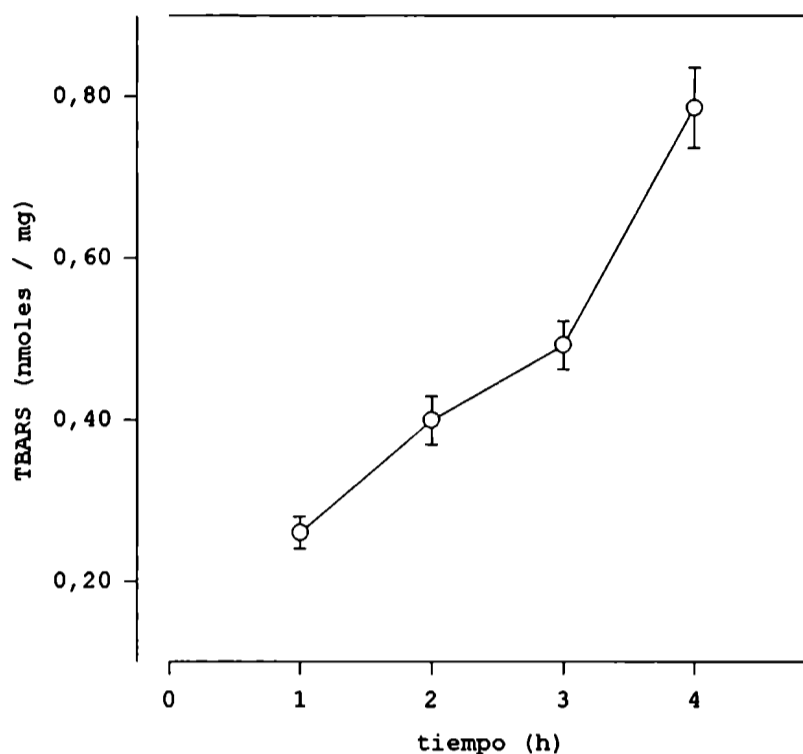


FIGURA R-III.2.: Efecto del ALA (1,0 mM) sobre la formación de TBARS en el particulado de cerebelo de rata en función del tiempo. El sistema de incubación y las determinaciones se indican en métodos.

Estos datos están dentro del orden a los obtenidos por Zaiton et al. (1993) en músculo extensor ($0,82 \pm 0,06$ nmoles/mg de proteína) y suero ($0,37 \pm 0,02$ nmoles/mg de proteína) de gato, incubados en presencia de un sistema generador de ROS, y también con los datos obtenidos por Lopez-Torres et al. (1993) en cerebro entero ($0,52 \pm 0,06$ nmoles/mg de tejido). Sin embargo es de un orden de magnitud menor al encontrado por acción de la indometacina sobre la fracción sobrenadante de 12000xg del homogenato de hígado de rata ($5,4 \pm 0,4$ nmoles/mg de proteína) (Kirkova et al., 1992).

La Figura R-III.3. muestra la formación de TBARS cuando se incubó el particulado de cerebelo con distintas concentraciones finales de ALA durante 4 h.

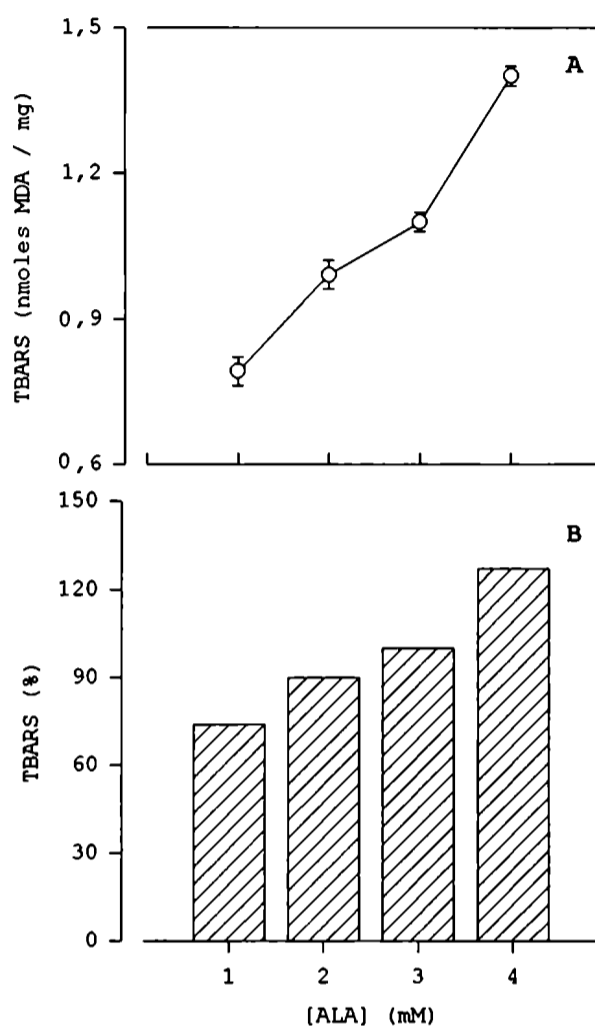


FIGURA R-III.3.: Efecto de distintas concentraciones finales de ALA sobre la formación de TBARS (A) en el particulado de cerebelo de rata incubado durante 4 h. El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos. Los porcentajes (B) se calcularon con respecto al control incubado sin ALA (1,102 nmoles/mg de proteína).

Se observa que la formación de TBARS es dependiente de la concentración de ALA alcanzando un 127% con 4,0 mM de ALA, con respecto al control incubado sin ALA.

Debido a estos niveles de peroxidación lipídica se decidió estudiar el efecto de "scavengers" de ROS: SOD, CAT y DMSO, cuyas características se detallarán posteriormente, sobre la formación de TBARS (Figura R-III.4.).

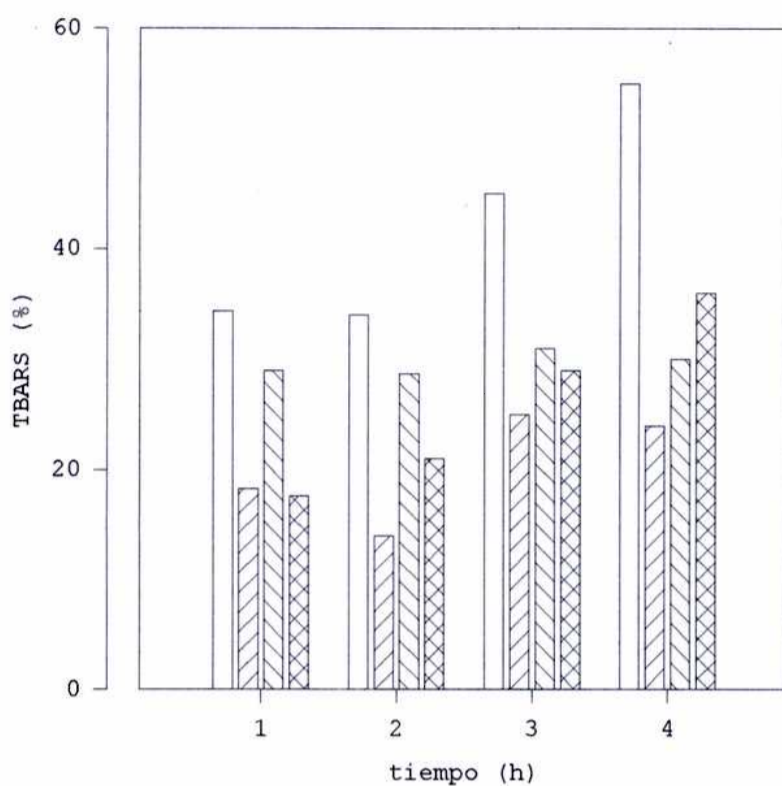


FIGURA R-III.4.: Efecto de los "scavengers" sobre la formación de TBARS. El particulado de cerebelo de rata se incubó en presencia de 1,0 mM de ALA sin "scavengers" (□) y con 50 U/ml de SOD (▨), 4,5 μ M de CAT (▩) o 150 mM de DMSO (▧) a distintos tiempos hasta 4 h. El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos. Los porcentajes se calcularon con respecto al control incubado sin ALA.

En todos los casos se observa que el agregado del "scavenger" al medio de incubación previene la lipoperoxidación inducida por las ROS generadas por autooxidación del ALA.

La SOD es la que disminuye en mayor grado ($p < 0,001$) la presencia de TBARS por constituir la primer defensa frente a las ROS. Como era de esperar cuando se emplearon la CAT y el DMSO se obtuvo un incremento en la generación de TBARS debido a la acción conjunta y combinada de las especies reactivas de oxígeno que no son secuestrados por los "scavengers" empleados en cada ensayo. La presencia de CAT (4,5 μ M) muestra que el efecto protector alcanza valores constantes ($p < 0,005$) a los distintos tiempos de incubación posiblemente por la reactividad del H_2O_2 o bien porque se llega a la saturación de la CAT.

Por otra parte se encuentra que el efecto del DMSO disminuye con el tiempo ($p < 0,001$) probablemente a causa de un aumento en la producción de $\text{OH}\cdot$ altamente reactivo, aunque no puede descartarse la acción combinada de las otras ROS no secuestradas por el DMSO.

También se analizó el efecto de los "scavengers" sobre la formación de TBARS en el particulado de cerebelo incubado en presencia de distintas concentraciones finales de ALA (1,0 - 4,0 mM) durante 4 h (Figura R-III.5.).

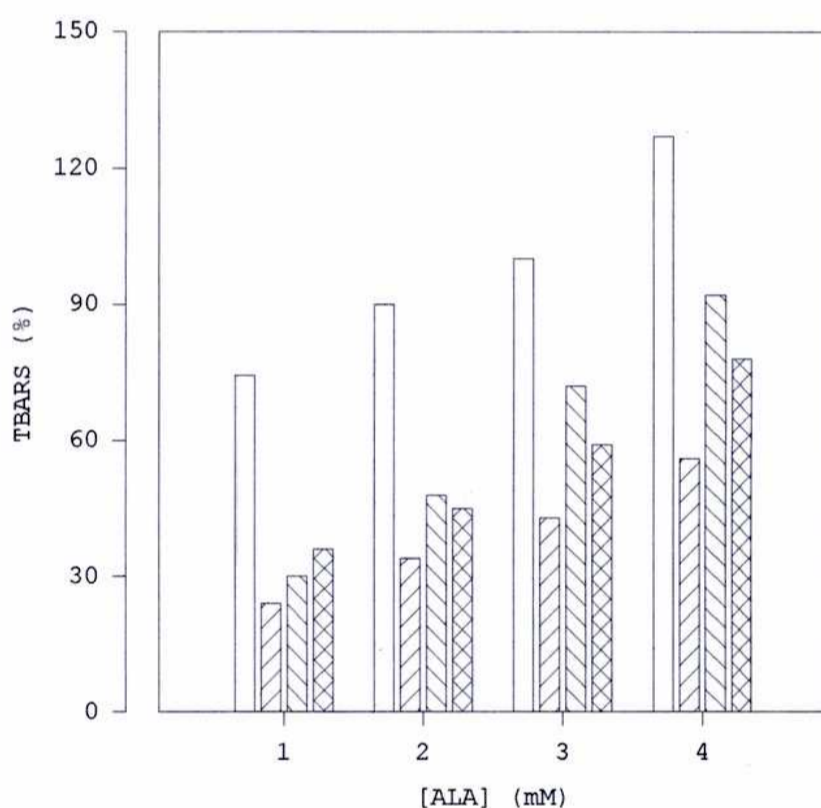


FIGURA R-III.5.: Efecto de los "scavengers" sobre la formación de TBARS. El particulado de cerebelo de rata se incubó durante 4 h en presencia de distintas concentraciones de ALA sin "scavengers" (□) y con 50 U/ml de SOD (▨), 4,5 μM de CAT (▩) o 150 mM de DMSO (▧). El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos. Los porcentajes se calcularon con respecto al control incubado sin ALA. ($p < 0,001$)

Al igual que en la Figura R-III.4. se observa que la SOD es la que muestra mayor efecto protector. Los tres "scavengers" ensayados ejercen una acción secuestrante de ROS altamente significativa, aunque ésta es menos efectiva a medida que aumenta la concentración de ALA, posiblemente a raíz de una mayor

cantidad de ROS formada y al mismo tiempo por saturación de los mismos "scavengers".

III.3. Efecto del anión superóxido

El $O_2^{\cdot-}$ es un agente sumamente tóxico, pequeñas cantidades pueden inducir efectos dañinos en la membrana *in vivo* por lipoperoxidación, que se van acumulando durante la vida. Se ubica en la matriz mitocondrial; interviene en los procesos fagocíticos encaminados a destruir material extraño que se haya introducido en el organismo y son mediadores importantes de la actividad bactericida de los leucocitos (Babior et al., 1973) y también se las encuentra en eritrocitos (Orten & Neuhaus, 1984).

Se forma como producto secundario de diversas reacciones enzimáticas (Fridovich & Handley, 1962; Rajagopalan et al. 1964; Fridovich, 1970; Rotilio et al., 1970). En soluciones acuosas tiene vida media muy corta y reacciona rápidamente con otras moléculas (Bielski & Allen, 1977; Bielski et al., 1985).

La SOD es una enzima altamente específica por el $O_2^{\cdot-}$. que cataliza su dismutación en H_2O_2 y O_2 . Se encuentra en diferentes 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 la SOD, se puede concluir que el $O_2^{\cdot-}$ jugaba un rol esencial en dicho proceso (Fridovich, 1974). La actividad de SOD en cerebro de rata es de 40 U/mg de proteína, menor que en pulmón (70 U/mg de proteína) y hígado (80 U/mg de proteína) (Perez-Campo et al., 1993).

En base a estos antecedentes se decidió estudiar el efecto del agregado de 50 U/ml de SOD al medio de incubación sobre la incorporación de ALA, la biosíntesis de PBG y la formación de porfirinas. Para ello se incubó particulado de cerebelo de rata con una concentración final de 1,0 mM de ALA en presencia del "scavenger" a distintos tiempos hasta 4 h de incubación.

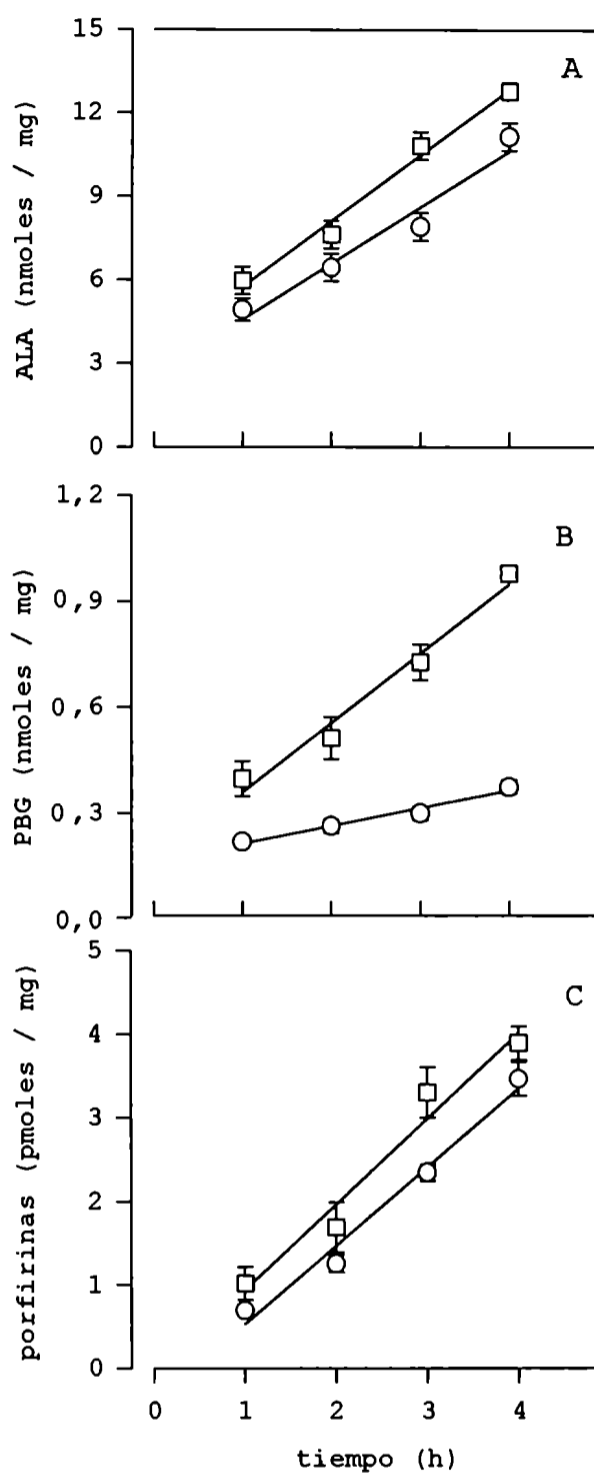


FIGURA R-III.6.: Efecto de la SOD (50 U/ml) sobre la incorporación de ALA (A), biosíntesis de PBG (B) y formación de porfirinas (C) en el particulado de cerebelo. Este se incubó durante 4 h en presencia de 1,0 mM de ALA y sin (○) o con SOD (□). El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

La Figura R-III.6.A. muestra que la incorporación de ALA al particulado de cerebelo es lineal con el tiempo tanto sin SOD ($r= 0,980$) como con el "scavenger" ($r= 0,990$). La diferencia no excede más del 25% ($p < 0,01$) (Figura R-III.7.) a todos los tiempos ensayados.

La biosíntesis de PBG también aumenta linealmente ($r= 0,995$; en el particulado incubado con SOD) con el tiempo de incubación (Figura R-III.6.B.) alcanzando un 170% a las 4 h ($p< 0,0005$) (Figura R-III.7.). Con respecto a la formación de porfirinas, ésta muestra un incremento lineal cuando se agregó 50 U/ml de SOD al medio de incubación ($r= 0,977$) (Figura R-III.6.C.) siendo siempre mayor la síntesis en presencia del "scavenger" (40 - 45%) ($p< 0,01$) (Figura R-III.7.).

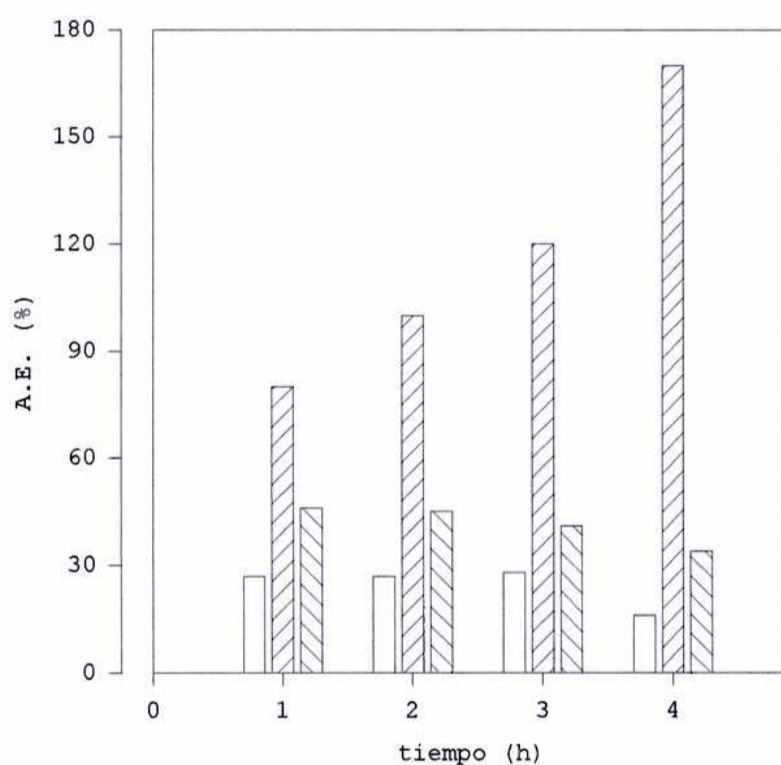


FIGURA R-III.7.: Efecto de la SOD (50 U/ml) sobre la incorporación de ALA (□), la biosíntesis de PBG (▨) y la formación de porfirinas (▩) en el particulado de cerebelo. Los porcentajes se calcularon con respecto a los incubados sin SOD.

Los resultados indican que la presencia de SOD en el medio de incubación no modifica significativamente el proceso de incorporación de ALA. Esto supone que el $O_2^{\cdot-}$ no actuaría sobre el sistema transportador ya sean vesículas endocíticas o proteínas transmembrana.

También se observa que la SOD protege las actividades de ALA-D y PBG-D ya que se obtiene un incremento altamente

significativo en la biosíntesis de PBG (170%, 1,0 mM de ALA y 4 h de incubación) y menor en la formación de porfirinas (50%, 1,0 mM de ALA y 1 h), respectivamente.

Paralelamente se realizaron otros ensayos tendientes a corroborar estos datos. Para ello se incubó la fracción homogenato de cerebelo, en las condiciones descritas en métodos tanto para la obtención de la fracción como para la medición de la actividad de ambas enzimas. Los resultados se resumen en la Tabla R-III.1.

TABLA R-III.1.: Efecto de la SOD sobre la actividad de ALA-D y PBG-D

Enzima	A.E. (nmoles/mg)		Efecto (%)
	Sin SOD	Con SOD	
ALA-D	0,51	0,61	19
PBG-D	0,024	0,025	4

El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos. Los errores en las A.E. están dentro del 1 - 2%.

Se observa que la presencia de SOD aumenta ligeramente la actividad del ALA-D probablemente protegiendo a la proteína de la acción de las ROS y no altera la de la PBG-D. En el caso del ALA-D el efecto es más notable por cuanto su sustrato, ALA, es el generador de ROS. La formación de porfirinas empleando ALA como sustrato inicial se encuentra disminuida en un 10%, aunque es un efecto menor podría deberse a un ataque por ROS o que las condiciones de incubación no son las óptimas para la biosíntesis de porfirinas.

Asimismo se analizó el efecto de la SOD sobre la incorporación de ALA, la biosíntesis de PBG y la formación de porfirinas en presencia de distintas concentraciones finales de

ALA (1,0 - 4,0 mM). Para ello se incubó el particulado de cerebelo de rata durante 4 h según se detalla en métodos.

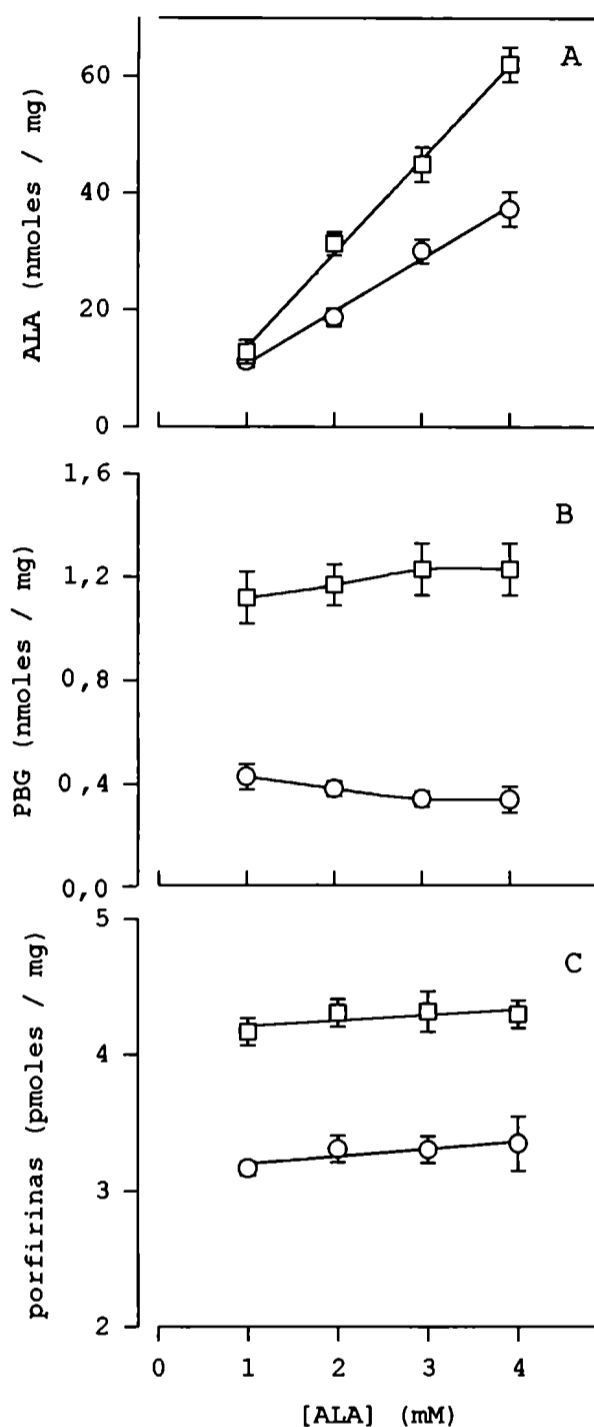


FIGURA R-III.8.: Efecto de la SOD (50 U/ml) sobre la incorporación de ALA (A), biosíntesis de PBG (B) y formación de porfirinas (C) en el particulado de cerebelo. Este se incubó durante 4 h en presencia de distintas concentraciones finales de ALA sin (○) o con (□) SOD. El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

La Figura R-III.8.A. muestra que la presencia de SOD aumenta la incorporación de ALA alcanzando un 45% a 4,0 mM de ALA. Cuando se analizó la biosíntesis de PBG se observaron dos efectos, uno es la reversión de la caída observada en la curva de sustrato (Figura R-II.5.B.) insinuándose que se ha alcanzado la

saturación (Figura R-III.8.B.), y por otro lado a 4,0 mM de ALA y 4 h de incubación la actividad de ALA-D se incrementó en un 170%.

Con respecto a la formación de porfirinas se observa una respuesta lineal con pendiente positiva algo mayor de 1 (Figura R-III.8.C.) ya descripta en el ítem II.3.2., con un incremento general de su síntesis del orden del 30%.

Por todos los datos obtenidos hasta aquí y considerando el significativo efecto protector que ejerce la SOD ($p < 0,001$) es posible que el $O_2^{\cdot-}$ estuviera comprometido en las disfunciones de las enzimas que se encuentran alteradas en la PAI, ya sea por un ataque directo a la proteína o por una alteración en su proceso de síntesis.

III.4. Efecto del peróxido de hidrógeno

Bajo ciertas condiciones se producen pequeñas cantidades de H_2O_2 a partir de la actividad de la SOD presente en las células, que luego se descompone por el sistema GSH-Px o por la CAT, dos enzimas que se encuentran normalmente en glóbulos rojos (Cohen & Hochstein, 1963; Jaffe, 1964; Orten & Neuhaus, 1984). En cerebro de rata ambas actividades poseen baja actividad (CAT: 10 U/mg de proteína; GSH-Px: 75 U/mg de proteína) en comparación con el hígado (CAT: 375 U/mg de proteína; GSH-Px: 1100 U/mg de proteína) (Perez-Campo et al., 1993).

La CAT es una de la enzimas más activas y coopera con la SOD en la reducción de los peróxidos. Su función fisiológica como secuestrante de H_2O_2 se limita a situaciones en las que los hidroperóxidos alcancen concentraciones celulares locales o generales muy elevadas (Chance et al., 1979). Como todas las especies reactivas de oxígeno el H_2O_2 tiene la capacidad de oxidar una variedad de sustratos (Chance & Herbert, 1950).

Para dilucidar si el peróxido de hidrógeno podría estar o no involucrado en el origen de las manifestaciones de la PAI se

incubó el particulado de cerebelo con $4,5 \mu\text{M}$ de CAT, concentración que protege las disfunciones de la membrana mitocondrial de hígado de rata (Hermes-Lima et al., 1991). Se estudió el efecto sobre la incorporación de ALA, la biosíntesis de PBG y la formación de porfirinas. Para ello se incubó particulado de cerebelo de rata con una concentración final de $1,0 \text{ mM}$ de ALA en presencia de CAT a distintos tiempos hasta 4 h.

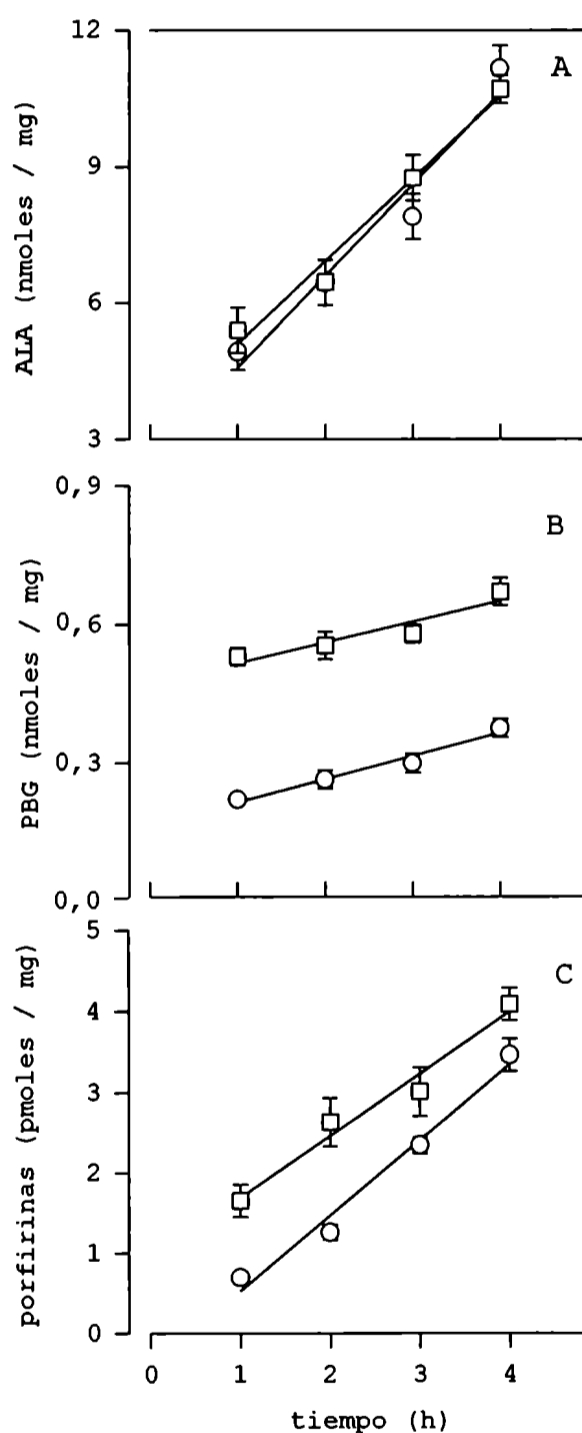


FIGURA R-III.9.: Efecto de la CAT ($4,5 \mu\text{M}$) sobre la incorporación de ALA (A), biosíntesis de PBG (B) y formación de porfirinas (C) en el particulado de cerebelo. Este se incubó durante 4 h en presencia de $1,0 \text{ mM}$ de ALA, con (□) o sin CAT (○). El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

La Figura R-III.9.A. muestra que la incorporación de ALA al particulado de cerebelo es lineal con el tiempo sin y con CAT ($r= 0,990$) con perfiles prácticamente idénticos lo cual también se observa en la Figura R-III.10.

La biosíntesis de PBG (Figura R-III.9.B.) también aumenta linealmente con ($r= 0,990$) o sin ($r= 0,994$) CAT. Se observa que, si bien hay un incremento significativo entre el 100 y 140% de la actividad, (Figura R-III.10.), la velocidad aparente de síntesis muestra la misma pendiente en ambas condiciones. Con respecto a la formación de porfirinas (Figura R-III.9.C.) también hubo un incremento lineal cuando se agregó CAT al medio de incubación ($r= 0,970$) obteniéndose un aumento del 162% a 1 h de incubación con respecto al incubado sin el "scavenger" (Figura R-III.10.).

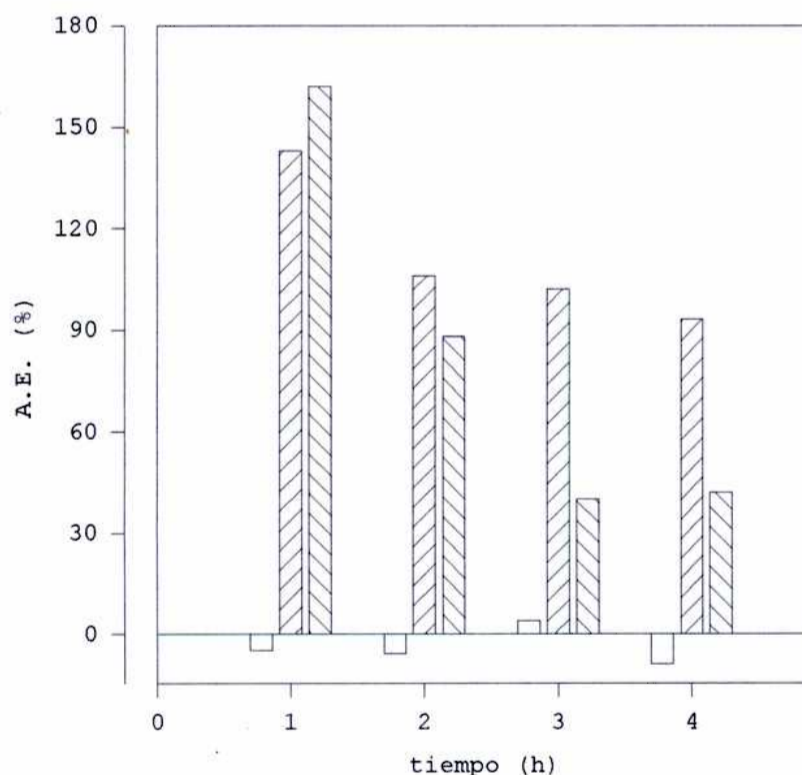


FIGURA R-III.10.: Efecto de la CAT ($4,5 \mu\text{M}$) sobre la incorporación de ALA (\square), la biosíntesis de PBG (///) y la formación de porfirinas (///) en el particulado de cerebelo. Los porcentajes se calcularon con respecto a los incubados sin CAT.

Los resultados indican que la presencia de CAT en el medio de incubación no modifica la incorporación del ALA, que se

metabolizaría rápidamente en PBG y porfirinas, probablemente como consecuencia de una mayor actividad de ALA-D y PBG-D, por cuanto se obtiene un incremento significativo en la biosíntesis de PBG (143%, 1,0 mM de ALA y 1 h de incubación; $p < 0,001$) y de porfirinas (160%, 1,0 mM de ALA y 1 h; $p < 0,001$).

Para apoyar esta propuesta se midieron las actividades de ALA-D y PBG-D en la fracción homogenato de cerebelo, en las condiciones descriptas en métodos, en presencia de una concentración final de 4,5 μM de CAT. Los resultados se ilustran en la Tabla R-III.2.

TABLA R-III.2.: Efecto de la CAT sobre la actividad de ALA-D y
PBG-D

Enzima	A.E. (nmoles/mg)		Efecto (%)
	Sin SOD	Con SOD	
ALA-D	0,51	0,99	91
PBG-D	0,024	0,027	10

El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos. Los errores en las A.E. están dentro del 1 - 2%.

Se observa que la presencia de CAT incrementa la actividad de ambas enzimas, si bien el mayor porcentaje se obtuvo para el ALA-D, indicando que esta enzima sería más vulnerable al ataque por el H_2O_2 y aunque el agregado del "scavenger" aumenta su actividad, la cantidad de PBG formado superaría la capacidad de la PBG-D, situación que estaría de acuerdo con la hipótesis de que esta enzima es un segundo paso limitante en la síntesis de porfirinas.

Para estudiar el efecto de la CAT (4,5 μM) sobre los parámetros anteriormente analizados en presencia de distintas

concentraciones finales de ALA (1,0 - 4,0 mM) se incubó el particulado de cerebelo de rata durante 4 h.

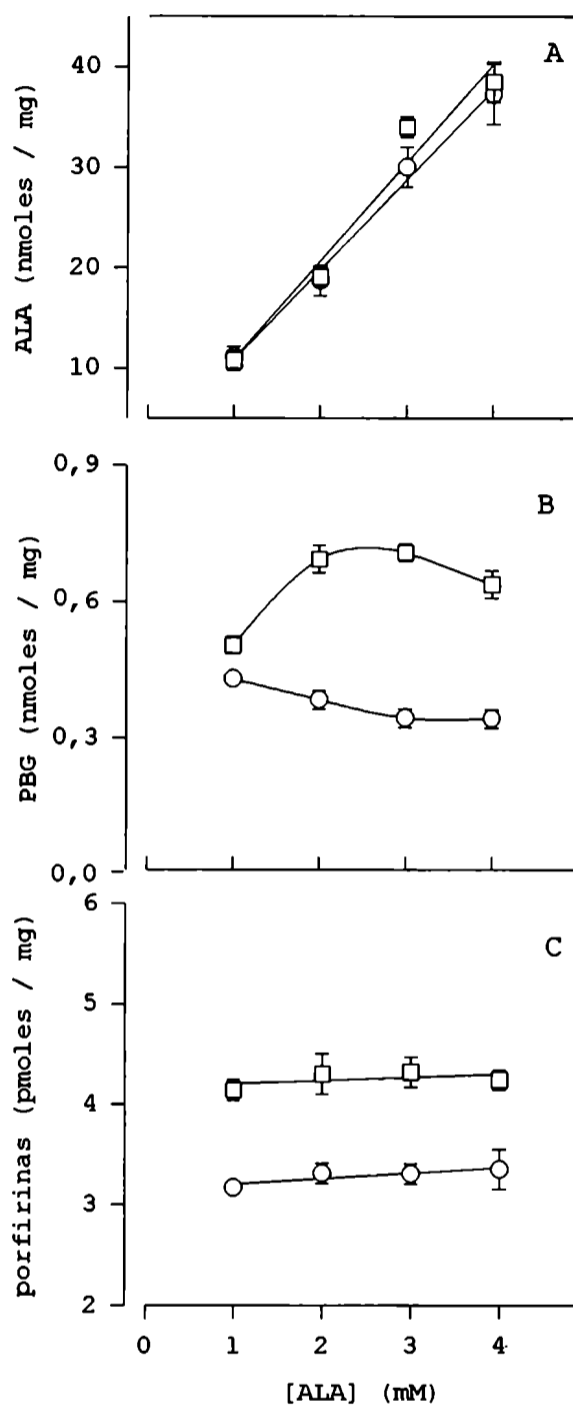


FIGURA R-III.11.: Efecto de la CAT (4,5 μ M) sobre la incorporación de ALA (A), biosíntesis de PBG (B) y formación de porfirinas (C) en el particulado de cerebelo. Este se incubó durante 4 h en presencia de distintas concentraciones finales de ALA y sin (○) o con (□) CAT. El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

La Figura R-III.11.A. muestra que no hay cambios significativos en la incorporación de ALA ($p < 0,1$). Cuando se analizó la biosíntesis de PBG se observaron los mismos efectos descritos para la SOD, una reversión de la caída en la curva de sustrato (Figura R-II.5.B.) adquiriendo la misma una forma

hiperbólica y llegando al plateau (Figura R-III.11.B.); además un incremento de 2,5 veces de la actividad de ALA-D ($p < 0,005$).

Con respecto a la formación de porfirinas se encuentra que existe un plateau (Figura R-III.11.C.) semejante al descrito en el ítem II.3.2. de resultados, pero con un aumento relativo en su síntesis del orden del 33% ($p < 0,001$).

III.5. Efecto del radical hidroxilo

Los complejos de hierro que existen naturalmente *in vivo* reaccionan con el H_2O_2 , generando $OH\cdot$ por la conocida reacción de Fenton (Gutteridge, 1985; Gutteridge & Halliwell, 1989). Esta reacción ocurre debido a la continua reducción del Fe(III) a Fe(II) por el $O_2^{\cdot-}$ y por lo tanto requiere cantidades submicromolares de hierro (Haseloff & Ebert, 1989; Tyrrell & Keyse, 1990).

El $OH\cdot$ es una especie altamente reactiva de vida media muy corta por lo tanto debe generarse muy cerca del sitio donde actuará. Por su pequeño tamaño difunde rápidamente pudiendo alcanzar ultraestructuras celulares.

No existe un "scavenger" enzimático específico para el $OH\cdot$, la célula emplea los ya descritos, SOD, CAT y GSH-Px para capturar los radicales precursores del $OH\cdot$ o bien quelantes del hierro. Entre las sustancias conocidas como secuestrantes de $OH\cdot$ se encuentran el manitol, el sorbitol, la glucosa y el dimetilsulfóxido. En este trabajo no se utilizaron los tres primeros porque interferían con las determinaciones a realizar. Por lo tanto se empleó aquí al DMSO como secuestrante de $OH\cdot$, ya utilizado en diversos sistemas biológicos (Repine et al., 1979) y que si bien no se le conoce función fisiológica alguna se ha demostrado que es un efectivo "scavenger" de $OH\cdot$. Así el DMSO (150 mM) reduce en un 98% la luminiscencia generada por el $OH\cdot$ cuando se induce con luminol (Rao et al., 1988) y tiene un efecto

protector frente a la inactivación del ALA-D, PBGasa, PBG-D y URO-D por esta especie reactiva (Afonso, 1992).

Con el objetivo de evaluar el compromiso del $\text{OH}\cdot$ en las disfunciones de la PAI se incubó el particulado de cerebelo de rata con una concentración final de 1,0 mM de ALA en presencia de DMSO (150 mM) a distintos tiempos hasta 4 h. Se estudió su efecto sobre la incorporación de ALA, la biosíntesis de PBG y la formación de porfirinas.

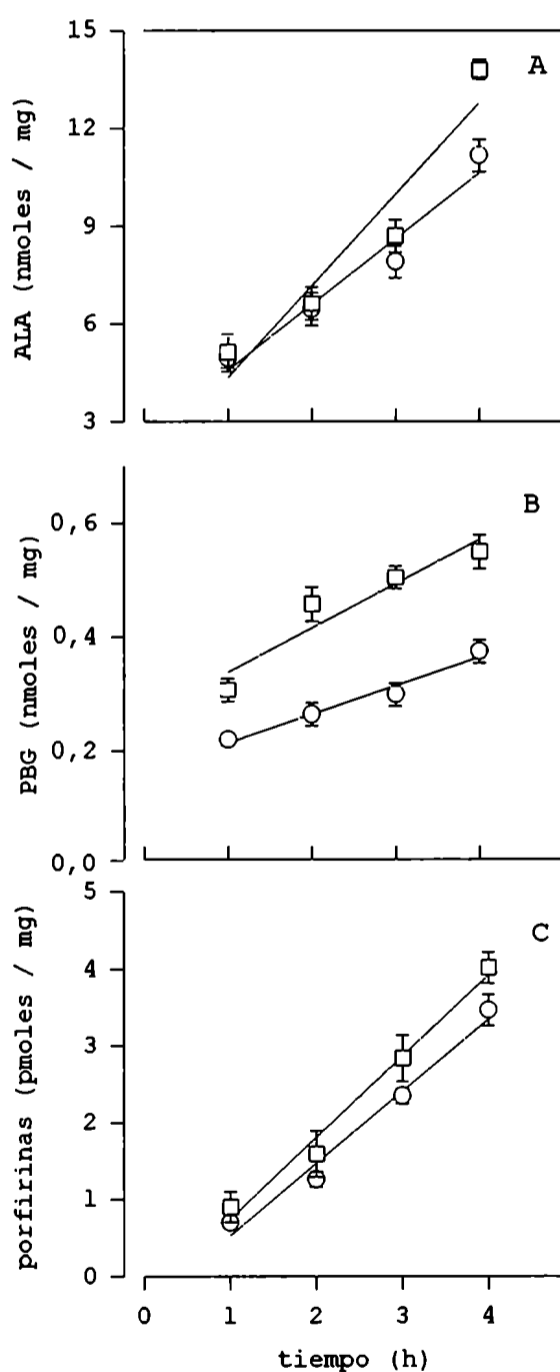


FIGURA R-III.12.: Efecto del DMSO (150 mM) sobre la incorporación de ALA (A), biosíntesis de PBG (B) y formación de porfirinas (C) en el particulado de cerebelo. Este se incubó hasta 4 h en presencia de 1,0 mM de ALA y sin (○) o con (□) DMSO. El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

La Figura R-III.12.A. muestra que la incorporación de ALA al particulado de cerebelo es lineal con el tiempo en ambos casos sin ($r= 0,990$) o con ($r= 0,970$) DMSO. La mayor pendiente obtenida en presencia de DMSO que alcanza un incremento del 20% a las 4 h ($p< 0,05$) (Figura R-III.13.) indica que el ALA se incorpora a mayor velocidad lo cual podría deberse a una mejor organización de los componentes de la membrana celular involucrados en la entrada del ALA.

La biosíntesis de PBG (Figura R-III.12.B.) también aumenta linealmente sin ($r= 0,994$) o con ($r= 0,970$) DMSO. Al igual que para la CAT no se observa efecto significativo sobre la velocidad aparente de síntesis en tanto que el aumento en la formación de PBG es cerca del 40% a 1 h de incubación ($p< 0,001$) (Figura R-III.13.). Con respecto a la formación de porfirinas también hay un incremento lineal sin o con agregado de DMSO (Figura R-III.12.C.) ($r= 0,980$) sin diferencias significativas entre ambas condiciones ($P< 0,05$) (Figura R-III.13.).

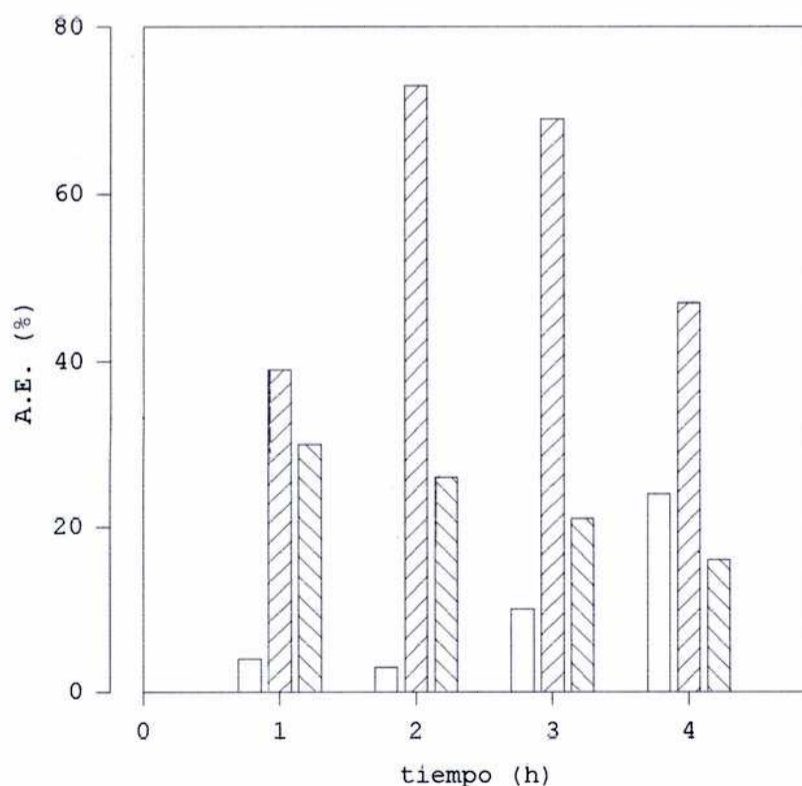


FIGURA R-III.13.: Efecto del DMSO (150 mM) sobre la incorporación de ALA (□), la biosíntesis de PBG (▨) y la formación de porfirinas (▩) en el particulado de cerebelo. Los porcentajes se calcularon con respecto a los incubados sin CAT.

Los resultados indican que la presencia de DMSO en el medio de incubación favorece la entrada de ALA a los tiempos más largos.

También se observa, al igual que con los otros dos "scavengers", que el DMSO protege a las enzimas citosólicas del camino biosintético del hemo.

También se midieron las actividades de ALA-D y PBG-D en la fracción homogenato de cerebelo, en ausencia y en presencia de una concentración final de 150 mM de DMSO. Los resultados se encuentran en la Tabla R-III.3.

TABLA R-III.3.: Efecto del DMSO sobre la actividad de ALA-D y de PBG-D

Enzima	A.E. (nmoles/mg)		Efecto (%)
	Sin DMSO	Con DMSO	
ALA-D	0,51	0,60	18
PBG-D	0,024	0,030	25

El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos. Los errores en las A.E. están dentro del 1 - 2%.

Se observa que en presencia de DMSO la actividad de ambas enzimas es mayor. La actividad de PBG-D es menor que la del ALA-D de acuerdo una vez más con el rol regulatorio asignado a esta enzima.

Asimismo, se estudió el efecto del DMSO (150 mM) sobre la incorporación de ALA, la biosíntesis de PBG y la formación de porfirinas cuando se incubó el particulado de cerebelo durante 4 h variando la concentración final de ALA hasta 4,0 mM.

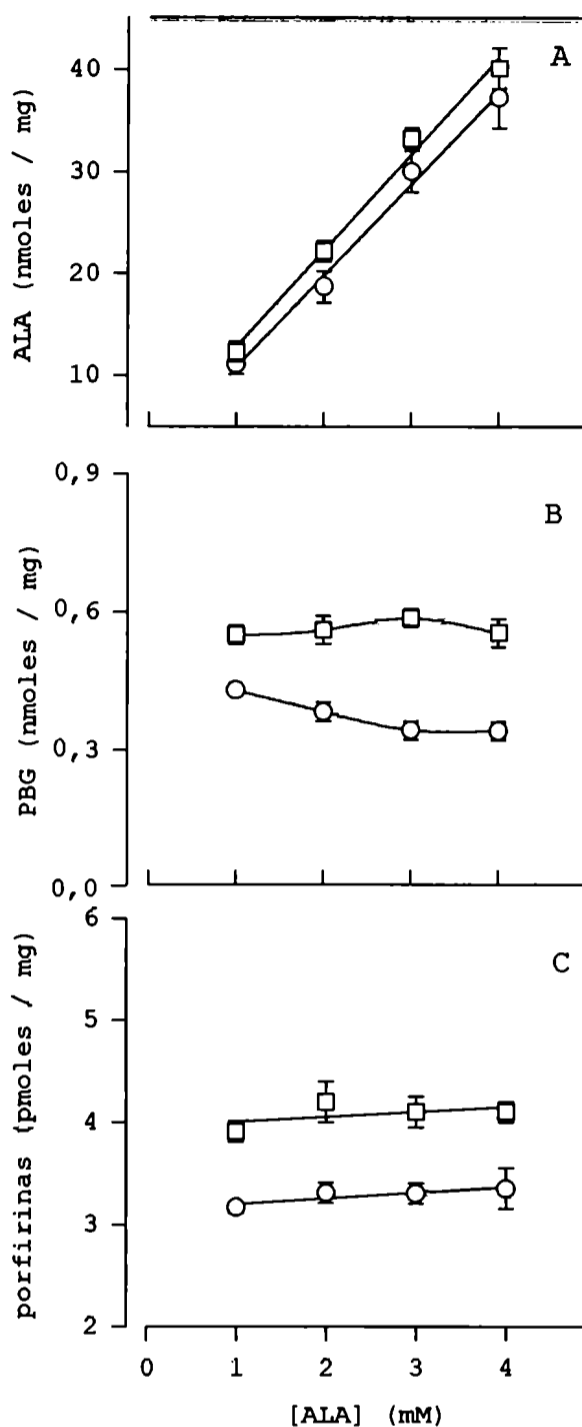


FIGURA R-III.14.: Efecto del DMSO (150 mM) sobre la incorporación de ALA (A), la biosíntesis de PBG (B) y la formación de porfirinas (C) en el particulado de cerebelo. Este se incubó durante 4 h en presencia de distintas concentraciones finales de ALA y sin (○) o con (□) DMSO. El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

La Figura R-III.14.A. muestra que la presencia de DMSO no modifica significativamente la incorporación de ALA ($p < 0,05$), apenas es un 10% mayor que en su ausencia. En ambos casos se observa una respuesta lineal ($r = 0,990$ y $r = 0,994$, sin y con DMSO respectivamente). En cuanto a la biosíntesis de PBG con DMSO también hubo una reversión de la caída del 20% en la curva de

-usitate) **(Figura R-III.14.B.)** - rezolvand: - platca **(Figura**
R-III.14.B.) - documente: stoc: - 150.000. - Antesi. - 150.000. - 150.000.
 (100)

- presena: - DMSO - formacio: - portirina: -
 - increment: - 100.000. - 100.000. **(Figura R-III.14.C.)**
 (100)

III.7. Bibliografía

- Afonso, S. (1992) Tesis Doctoral, FCEyN / UBA
- Babior, B.M.; Kepner, R.S. & Curnette, J.T. (1973) *J. Clin. Invest.*, 52, 741.
- Bielski, B.H. & Allen, A.O. (1977) *J. Phys. Chem.*, 81, 1048.
- Bielski, B.H., Cabelli, D.E., Arudi, R.L. & Ross, A.B. (1985) *J. Phys. Chem.*, 14, 1041.
- Chance, B.; Sies, H. & Boveris, A. (1979) *Physiol. Rev.*, 59, 527.
- Chance, B. & Herbert, D. (1950) *Biochem. J.*, 46, 402.
- Cohen, G. & Hochstein, P. (1963) *Biochemistry*, 2, 1420.
- Dahle, L.K.; Hill, E.G. & Holman, R.T. (1962) *Arch. Biochem. Biophys.*, 98, 253.
- Fraga, C.G.; Onuki, J.; Lucesoli, F.; Bechara, E.J. & Di Mascio, P. (1994) *Carcinogenesis*, 15, 2241.
- Fridovich, I. (1970) *J. biol. Chem.*, 245, 4053.
- Fridovich, I. (1974) en *Advances in Enzymology* [Meister, A. (eds.)]; Interscience; XLI, 35.
- Fridovich, I. (1978) *Science*, 209, 875.
- Fridovich, I. & Handley, P. (1962) *J. biol Chem.*, 237, 961.
- Girotti, A.W.; Thomas, J.P. & Jordan, J.E. (1985) *Photochem. Photobiol.*, 41, 267.
- Gutteridge, J.M. & Halliwell, B. (1989) en *Clinical Haematology: Iron chelating therapy* [Hershko, C (ed.)]; Bailliere Tindall, London; 195.
- Gutteridge, J.M. (1985) *FEBS Lett.*, 185, 19.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1984) *Biochem. J.*, 219, 1.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, 246, 501.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. (1989) en *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, 188.
- Haseloff, R.F. & Ebert, B. (1989) *J. Photochem. Photobiol.*, 3, 593.
- Helson, L.; Braverman, S. & Mangiardi, J. (1993) *Neurochem. Res.*, 18, 1255.
- Hermes-Lima, M.; Valle, E.R.; Vercesi, A.E. & Bechara, E.J. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1056, 57.
- Jaffe, E.R. (1964) en *Metabolic Processes Involved in the Formation and Reduction of Methemoglobin in Human Erythrocytes* [Bishop, C. & Surgenon, D.M. (eds.)]; Academic Press, New York; II, 397.
- Kappus, H. (1985) en *Oxidative Stress* [Sies, E. (ed.)]; Academic Press, Orlando; 273.
- Kirkova, M.; Kassabova, T. & Russanov, E. (1992) *Gen. Pharmacol.*, 23, 503.
- Logani, M.K. & Davies, R.E. (1980) *Lipids*, 15, 485.
- Lopez-Torres, M.; Perez-Campo, R.; Cadenas, S.; Rojas, C. & Barja, G. (1993) *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B, 757.

- Onuki, J.; Medeiros, M.H.; Bechara, E.J. & Di Mascio, P. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, 1225, 259.
- Orten, J.M. & Neuhaus, O.W. (1984) en *Bioquímica Humana, Médica Panamericana*, 507.
- Pereira, B.; Curi, E.; Kokubun, E. & Bechara, E.J. (1992) *J. Appl. Physiol.*, 72, 226.
- Perez-Campo, R.; López-Torres, M.; Rojas, C.; Cadenas, S. & Barja, G. (1993) *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B, 749.
- Rajagopalan, K.V.; Fridovich, I. & Handler, P. (1964) *J. Biol. Chem.*, 239, 2022.
- Rao, P.S.; Luber, J.M.; Milinowicz, J.; Lalezar, P. & Mueller, H. (1988) *Academic Press*, 39.
- Repine, J.E.; Eaton, J.W.; Anders, M.W. ; Hoidal, J.R. & Fox, J. (1979) *Clin. Invest.*, 64, 303.
- Rotilio, G.; Clabrese, L.; Finazzi-Agró, A.P. & Mandorri, B. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, 198, 618.
- Tyrrell, R.M. & Keyse, S.M. (1990) *J. Photochem. Photobiol B: Biology*, 4, 349.
- Zaiton, Z.; Merican, Z.; Khalid, B.A.; Mohamed, J.B. & Baharom, S. (1993) *Gen. Pharmacol.*, 24, 195.

CAPITULO IV

"EFECTO GLUCOSA"

	Página
IV.1. Efecto del ALA sobre la captación glucosa.....	173
IV.2. Efecto de los "scavengers"	178
IV.3. Importancia biológica del "efecto glucosa".....	185
IV.4. Bibliografía.....	189

IV. "EFECTO GLUCOSA"

IV.1. Efecto del ALA sobre la captación de glucosa

Como se describió, la Porfiria Aguda Intermitente (PAI) es un error del metabolismo de las porfirinas debido a una deficiencia primaria de la enzima PBG-D, con aumento secundario de la actividad del ALA-S. La inducción del ALA-S también ocurre por acción de diversos compuestos llamados porfirinogénicos, como la alilisopropilacetamida (AIA) y puede revertirse por administración de carbohidratos (Tschudy *et al.*, 1964). Este fenómeno, que ya se había demostrado para otras enzimas, se llamó "efecto glucosa". En la PAI o en su porfiria experimental se correlaciona el aumento de hidratos de carbono en la dieta con una disminución en la excreción de los precursores ALA y PBG (Rose *et al.*, 1961; Welland *et al.*, 1964); además, los ataques que pueden desencadenarse con el ayuno, se revierten a menudo con una dieta rica en carbohidratos (Tschudy, 1974).

No está claro cuál es el mecanismo de acción de los carbohidratos en el tratamiento de las crisis agudas de PAI (Wetterberg, 1976).

Estudios con 2-deoxi-D-glucosa, un inhibidor competitivo y no metabolizable de la glucosa, permitieron establecer que las alteraciones en la actividad funcional de diferentes regiones del cerebro están directamente asociadas con cambios en la demanda de energía, que se ve reflejada en la captación diferencial de este compuesto (Sokoloff, 1977), así como también que el transporte de la glucosa en las células nerviosas es un paso limitante en la glucólisis.

Se ha encontrado que la incubación de células neuronales con ALA durante varios días, disminuye la captación en un 14% respecto a los controles sin ALA, en tanto que el PBG no la

afecta significativamente (Russell et al., 1982). Sin embargo, en incubaciones de 15 min el transporte no se afectó. Esta disminución en la captación de la glucosa refleja una inhibición en la actividad funcional en el cerebro. Los resultados obtenidos con ALA sugieren que la concentración de ALA (10 μ M) empleada, que sería la esperada en el líquido cerebro espinal de pacientes con PAI, no solo disminuye el número de células (Percy et al., 1981) sino que también afecta la funcionalidad de las células remanentes. Entonces el ALA parece actuar directa y/o indirectamente sobre la utilización de la glucosa por parte de las células neuronales.

Los resultados obtenidos con el PBG por Russell et al. (1982) están de acuerdo con los de Taljaard et al. (1981) y agregan que el PBG no tendría acción neurotóxica mientras que el ALA sí.

El efecto del ALA sobre el metabolismo energético en las neuronas es de particular importancia para pacientes con porfiria aguda. Si en la célula nerviosa de estos pacientes la producción de hemo no es óptima la demanda repentina de energía requerirá un incremento en la biosíntesis de hemoproteínas, esenciales para la respiración mitocondrial, que no podrá ser satisfecha.

A diferencia de otros tejidos, bajo condiciones normales, el cerebro depende casi exclusivamente de la glucosa como fuente de energía; fallas en su producción y empleo estarían asociadas a las alteraciones en su actividad funcional (Sokoloff, 1977).

Por lo tanto es de interés evaluar el efecto del ALA sobre la captación de glucosa empleando el sistema de particulados de cerebelo de rata.

Se incubó el particulado de cerebelo hasta 4 horas, en presencia de una concentración fisiológica de glucosa (1 g/l) y 1,0 mM de ALA.

La Figura R-IV.1. muestra la desaparición de glucosa que se determinó midiendo la cantidad residual en el medio luego de la incubación, observándose una disminución lineal con el tiempo cuando se incubó en presencia o ausencia de ALA.

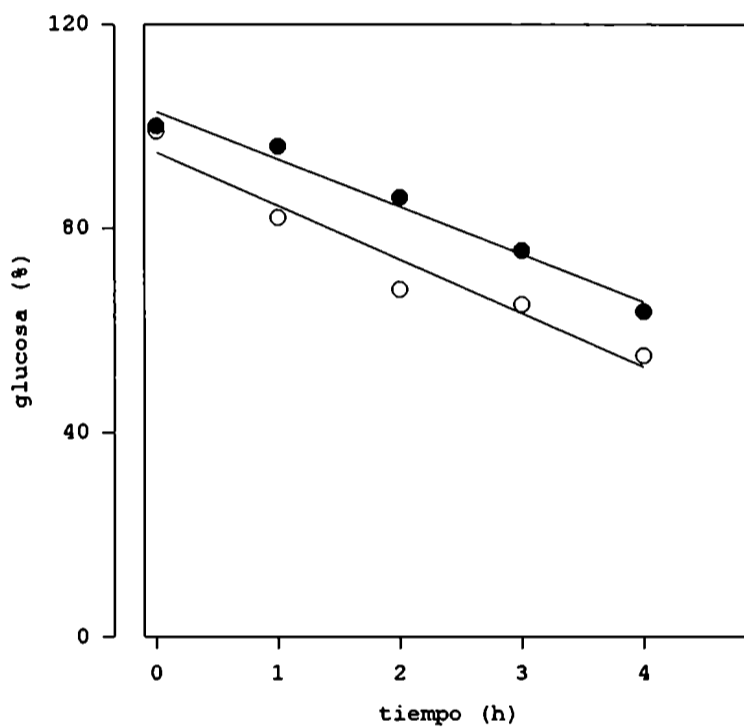


FIGURA R-IV.1.: Desaparición de glucosa del medio luego de la incubación del particulado de cerebelo (7 mg de proteína) durante diferentes periodos, sin (○) ($r= 0,994$) o con (●) ($r= 0,982$) 1,0 mM de ALA. Los valores son expresados como porcentaje de los controles.

La Figura R-IV.2. muestra que la captación de glucosa por el particulado de cerebelo de rata es lineal con el tiempo de incubación tanto sin ($r= 0,940$) como con 1,0 mM ($r= 0,945$) o con 4,0 mM ($r= 0,940$) de ALA; además se observa que la presencia de ALA interfiere en la captación de glucosa.

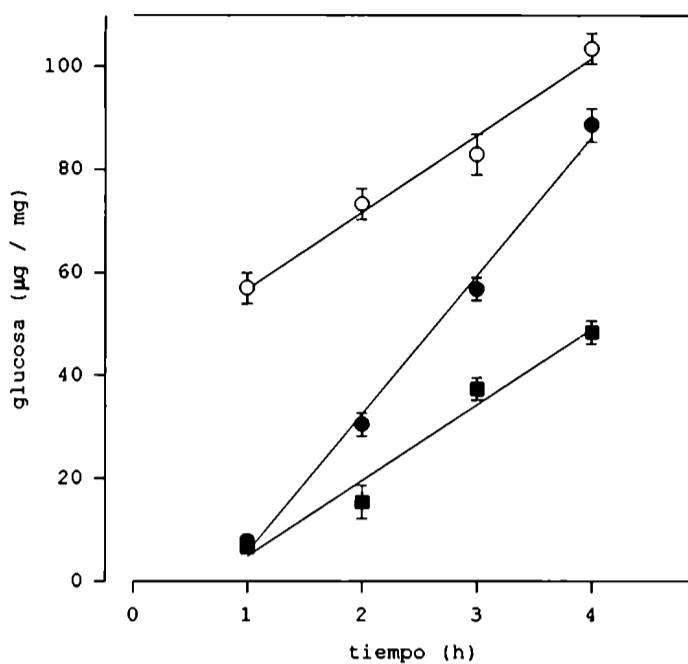


FIGURA R-IV.2.: Captación de glucosa por el particulado de cerebelo (7 mg de proteína) incubados sin (O) o con 1,0 mM (●) o 4,0 mM (■) durante diferentes periodos.

Como se indicara ya en 1982, Russell et al. describieron el efecto del ALA sobre la captación de 2-deoxi-D-glucosa en cultivos neuronales expuestos a 1,0 mM de ALA durante 4 h; inicialmente se observó una estimulación de la captación en un 29% y luego de 19 h disminuyó a 76% de los controles. En el particulado de cerebelo incubado en presencia de concentraciones fisiológicas de glucosa (Figura R-IV.1.) se alcanzó el nivel *in situ* de 0,5 g/l luego de 4 h de incubación y el agregado de 1,0 mM de ALA inhibió la captación de glucosa por parte de las células (Figura R-IV.2.). Estos resultados son consistentes con el hecho de que puede desencadenarse un ataque agudo con el ayuno y que una dieta rica en carbohidratos es beneficiosa para los pacientes con PAI.

Por otra parte, se analizó el efecto de distintas concentraciones finales de ALA (1,0 - 4,0 mM) sobre la captación de glucosa por el particulado de cerebelo incubado durante 4 h (Figura R-IV.3.).

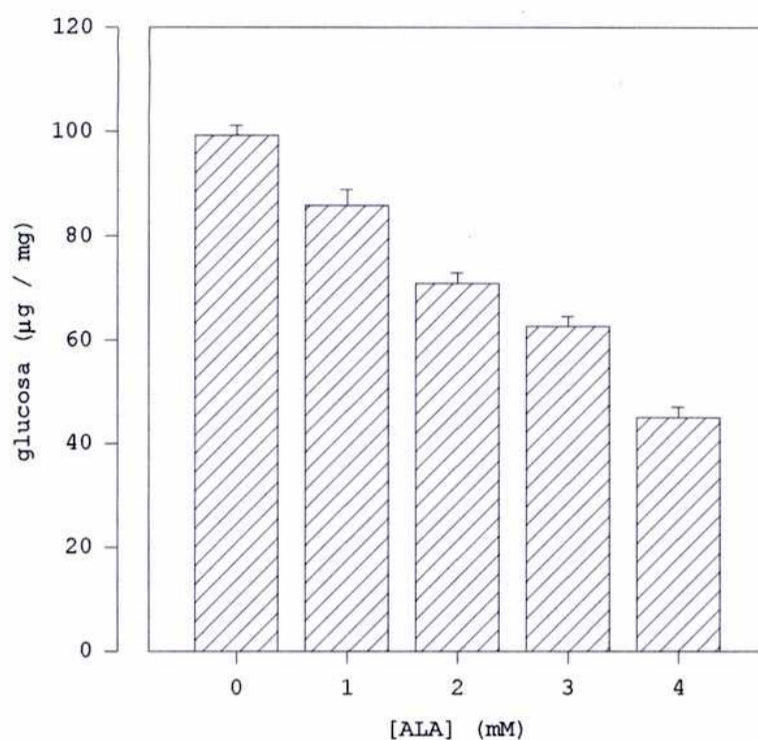


FIGURA R-IV.3.: Captación de glucosa por el particulado de cerebelo incubado durante 4 h con distintas concentraciones de ALA. El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

Se observa que la presencia de ALA inhibe el captación de glucosa alcanzando un 50% para 4,0 mM de ALA. Esto indica que de alguna forma el ALA interfiere en la entrada de glucosa al particulado, ya sea bloqueando el transportador o alterando su síntesis o bien afectando la glucólisis.

Se conocen seis subtipos de transportadores de glucosa agrupados en la serie GLUT, de ellos el GLUT3 está presente principalmente en el sistema nervioso.

La investigación tanto sobre animales enteros como sobre cultivos celulares ha revelado que muchos sustratos, como la glucosa, pueden regular la expresión de sus transportadores; entonces la interferencia en la captación de glucosa ejercida por el ALA produciría un aumento en su síntesis. Se observa que este efecto lleva a la menor diferencia (sin y con 1,0 mM de ALA) luego de 4 h de incubación, momento en el cual la célula se encuentra en una situación energética extrema.

IV.2. Efecto de los "scavengers"

Como se describió en el ítem III.1., las ROS actúan alterando la funcionalidad de diversas estructuras celulares a través de modificaciones en lípidos, ADN y proteínas. Estos efectos podrían deteriorar los procesos de incorporación y/o consumo de glucosa por parte de las células nerviosas con la consecuente disfunción energética y celular. Por lo tanto se decidió estudiar el efecto de los "scavengers" de ROS sobre la captación de este hidrato de carbono. Para ello se incubó al particulado de cerebelo de rata en presencia de 1,0 mM de ALA y de los distintos secuestrantes: CAT (4,5 μM), SOD (50 U/ml) y DMSO (150 mM).

La Figura R-IV.4. muestra el efecto de la SOD sobre la captación de glucosa.

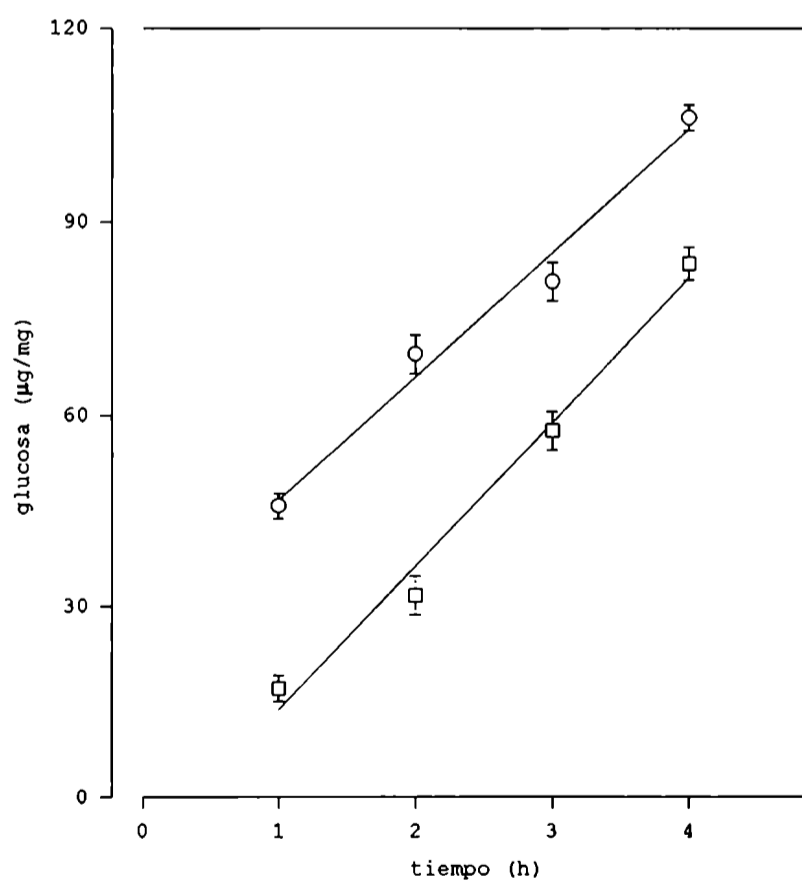


FIGURA R-IV.4.: Efecto de la SOD (50 U/ml) sobre la captación de glucosa en presencia y ausencia de ALA (1,0 mM). El particulado de cerebelo fue incubado sin (○) ($r= 0,986$) o con ALA (□) ($r= 0,980$). El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

Como ya se describió (Figura R-IV.2.) la presencia de 1,0 mM de ALA afecta la captación de glucosa por parte del particulado. Este efecto no se revierte por la presencia de 50 U/ml de SOD indicando que el $O_2^{\cdot-}$ no estaría involucrado en este proceso.

También se analizó si la presencia de CAT en el medio de incubación afecta la captación de este carbohidrato. Para ello se incubó al particulado de cerebelo con 1,0 mM de ALA con o sin CAT (4,5 μ M) a distintos tiempos hasta 4h.

En la Figura R-IV.5., análogamente al caso anterior (Figura R-IV.4.) se aprecia que la CAT no modifica la acción inhibitoria del ALA en la captación de glucosa.

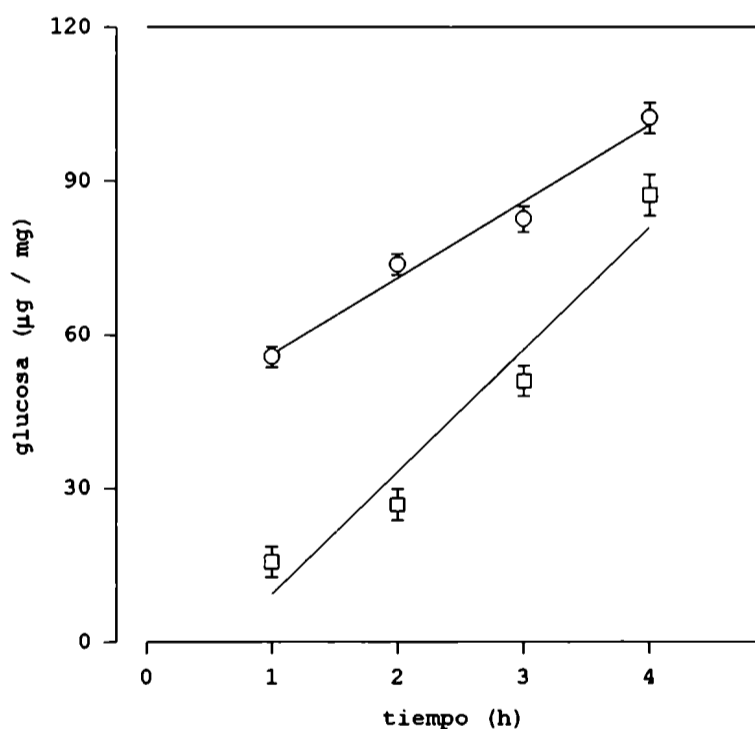


FIGURA R-IV.5.: Efecto de la CAT (4,5 μ M) sobre la captación de glucosa en presencia o ausencia de ALA (1,0 mM). El particulado de cerebelo fue incubado sin (O) ($r= 0,990$) o con ALA (□) ($r= 0,945$). El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

Por último se analizó si la presencia de un "scavenger" de $OH\cdot$ como el DMSO, afecta los parámetros hasta ahora analizados.

Para ello se incubó al particulado de cerebelo en presencia de 1,0 mM de ALA con o sin DMSO.

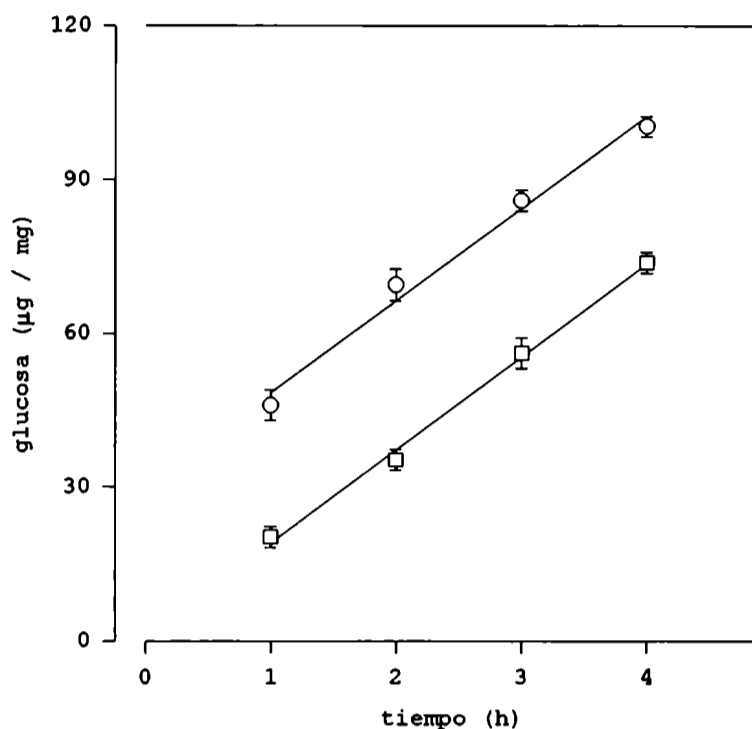


FIGURA R-IV.6.: Efecto del DMSO (150 mM) sobre la captación de glucosa en presencia o ausencia de ALA (1,0 mM). El particulado de cerebelo fue incubado sin (○) ($r= 0,994$) o con ALA (□) ($r= 0,995$). El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos.

La presencia de 150 mM de DMSO (Figura R-IV.6.) tampoco revierte la inhibición de la captación de glucosa por 1,0 mM de ALA en el particulado de cerebelo indicando que el OH. no estaría comprometido en este proceso.

Ninguno de los tres "scavengers" ensayados revirtió el efecto ejercido por el ALA, concluyéndose que las ROS generadas por su autooxidación no estarían comprometidas en la captación ni en la metabolización de glucosa en las condiciones hasta aquí ensayadas.

En la Figura R-IV.7. se muestra la captación de glucosa calculada en presencia de ALA y/o del "scavenger" como porcentaje con respecto los controles sin ALA.

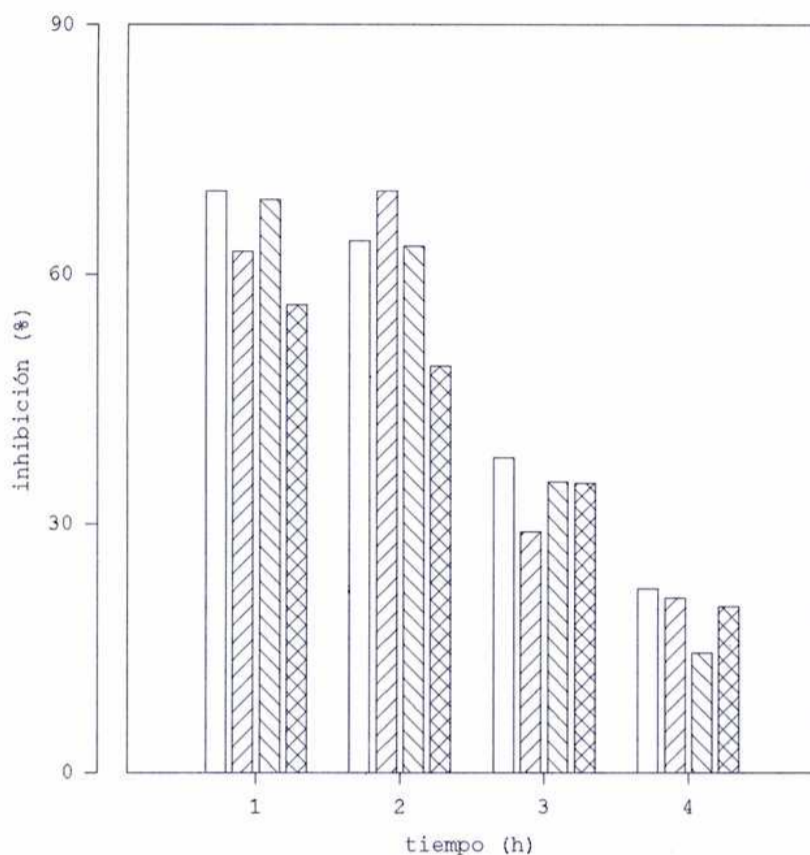


FIGURA R-IV.7.: Efecto de los "scavengers" sobre la captación de glucosa por el particulado de cerebelo de rata. Se incubó con 1,0 mM de ALA sin "scavenger" (□) y con 50 U/ml de SOD (▨), 4,5 μ M de CAT (▩) o 150 mM de DMSO (▧). Los porcentajes se calcularon en base a sus respectivos controles incubados sin ALA ($p < 0,05$).

No se observan diferencias significativas cuando se analiza la captación en presencia de los "scavengers" con respecto al obtenido al incubarse con 1,0 mM de ALA. Como ya hemos indicado esto sugiere que las ROS no afectarían la actividad o síntesis de los transportadores de glucosa.

Por otro lado, Naftalin & Rist (1993) encontraron que en macrófagos de rata la generación de $O_2^{\cdot-}$ es totalmente dependiente de la captación de hexosas, sugiriendo que existe un acople entre los transportadores de glucosa y el proceso respiratorio, generador de ROS y consumidor de glucosa. Algo similar podría suceder en nuestro sistema, al captarse menos glucosa, por efecto del ALA, la cadena respiratoria se encontraría alterada y se generaría menos radical superóxido. De

esta manera, la SOD se encontraría frente a una menor concentración de sustrato y no ejercería un efecto detectable.

Nalini et al. (1993) observaron que vesículas de membranas del borde interno del intestino del mono, expuestas a distintos sistemas generadores de ROS, como cumeno-hidroperóxido ó Fe^{2+} / ascorbato, sufrían alteraciones en el transporte de glucosa y que la inclusión de SOD en el sistema de incubación, no modificaba este efecto.

En este trabajo también se ha determinado la desaparición de glucosa del medio de incubación en presencia de los "scavengers" (Figura R-IV.8.), que se calculó como la cantidad de glucosa remanente en el medio luego de la incubación.

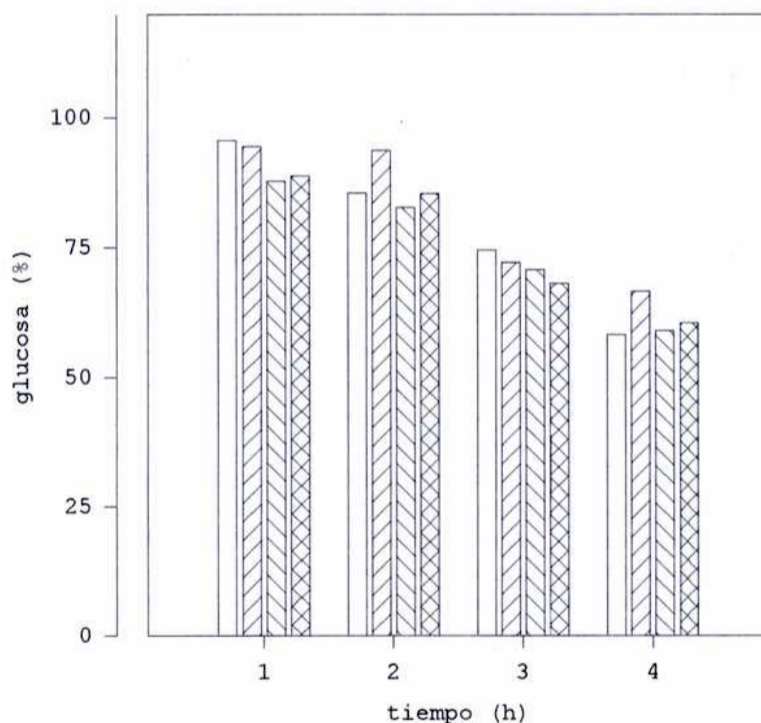


FIGURA R-IV.8.: Efecto de los "scavengers" sobre la desaparición de glucosa del medio durante distintos periodos. El particulado de cerebelo de rata se incubó con 1,0 mM de ALA sin "scavenger" (□) y con 50 U/ml de SOD (▨), 4,5 μM de CAT (▩) o 150 mM de DMSO (▧). Los porcentajes se calcularon en base a sus respectivos controles incubados sin ALA ($p < 0,05$).

La Figura R-IV.8. muestra que la glucosa remanente disminuye con el tiempo de incubación en todos los casos y además

que la presencia de los "scavengers" si bien permite mayor entrada de glucosa al particulado, no se observa una diferencia significativa con respecto al incubado con ALA solo. Esto indicaría que las ROS no cumplen un rol fundamental en la captación de glucosa.

Se estudió el efecto sobre la desaparición de glucosa del medio cuando se incubó el particulado de cerebelo durante 4 h y con distintas concentraciones finales de ALA (1,0 - 4,0 mM) en presencia de los "scavengers" a las concentraciones anteriormente indicadas (Figura R-IV.9.).

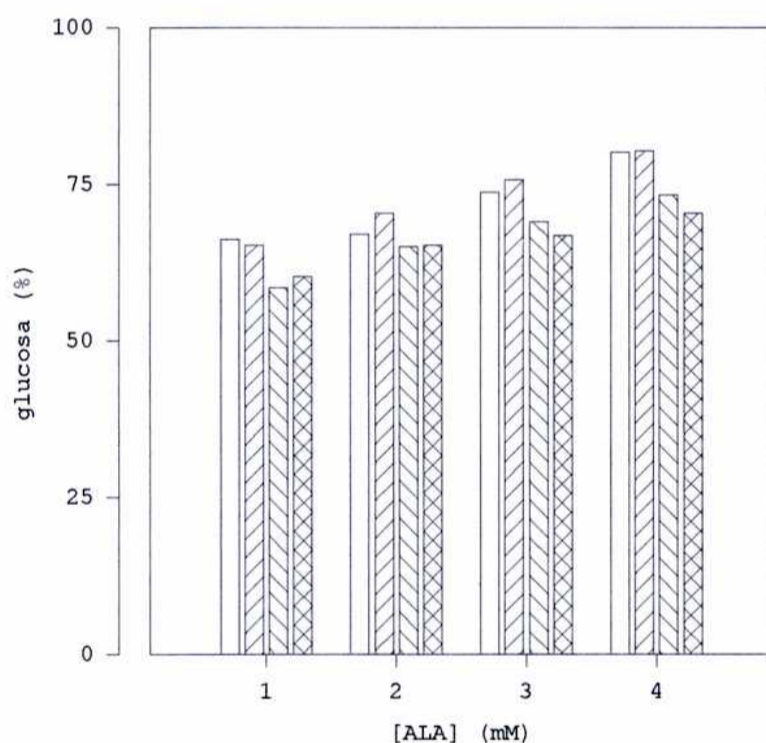


FIGURA R-IV.9.: Efecto de los "scavengers" sobre la desaparición de glucosa del medio en presencia de distintas concentraciones finales de ALA. El particulado se incubó durante 4 h con ALA sin "scavengers" (□) y con 50 U/ml de SOD (▨), 4,5 μ M de CAT (▩) o 150 mM de DMSO (▧). Los porcentajes se calcularon en base a sus respectivos controles incubados sin ALA ($p < 0,05$).

La presencia de los "scavengers" no altera significativamente la inhibición en la entrada de glucosa al particulado ejercida por el ALA. Esto se refleja en el mayor

porcentaje obtenido en cada incubación cuando estuvo presente el ALA; nuevamente se deduce que las ROS no afectan este proceso.

Además se observa que la SOD es la que muestra menor efecto posiblemente debido a que el $O_2^{\cdot-}$ no estaría comprometido directamente en la inhibición observada en la desaparición de glucosa. Existe mayor efecto cuando se incubó con los otros dos "scavengers", si bien la diferencia es mínima, cerca del 10%, indicaría que el H_2O_2 y el OH^{\cdot} afectan parcialmente este proceso.

Se analizó la captación de glucosa por el particulado de cerebelo de rata incubado en presencia de distintas concentraciones de ALA (1,0 - 4,0 mM) y de los "scavengers" (Figura R-IV.10.), durante 4 h.

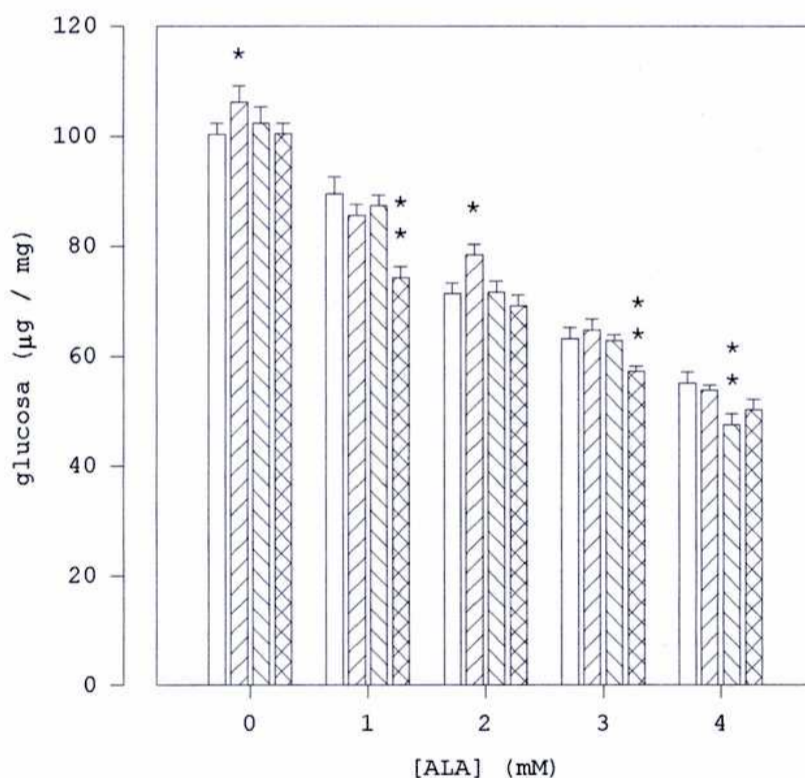


FIGURA R-IV.10.: Efecto de los "scavengers" sobre la captación de glucosa por el particulado de cerebelo de rata en presencia de distintas concentraciones finales de ALA. Se incubó durante 4 h con ALA sin "scavengers" (□) y con 50 U/ml de SOD (▨), 4,5 µM de CAT (▩) o 150 mM de DMSO (▧). El sistema de incubación y las determinaciones se detallan en métodos (* p < 0,01; ** p < 0,005).

En la Figura R-IV.10. se observa que la presencia de SOD no altera el efecto que produce el ALA mientras que los otros dos "scavengers" lo modifican significativamente.

El ALA ejercería entonces un doble efecto. Por un lado inhibiendo la captación de glucosa al alterar o bloquear de alguna manera su transportador y por otro, tal vez, atacando por medio de las ROS la síntesis o actividad de las enzimas glucolíticas.

IV.3. Importancia biológica de "efecto glucosa"

Como se ha demostrado antes la captación y/o consumo de glucosa se encuentran inhibidas cuando el particulado de cerebelo se incuba en presencia de ALA. Esto constituiría un reflejo de una crisis de PAI, durante la cual existe una concentración elevada de ALA circulante, que al llegar al cerebro podría producir los efectos mencionados.

La glucosa es el mayor nutriente para el cerebro y la vida de la célula nerviosa depende de su disponibilidad. Cuando la glucosa en sangre disminuye significativamente se desencadenan una serie de procesos que pueden llevar a la muerte celular. Por ello, el sistema nervioso es especialmente vulnerable a una caída masiva en el contenido de glucosa, si se tiene en cuenta que el cerebro consume el 15% de la glucosa total disponible, y que el peso de cerebro representa solo el 2,5% del total del peso del cuerpo (Keele et al., 1982).

Los requerimientos energéticos del tejido cerebral están relacionados, bajo condiciones normales, casi exclusivamente al metabolismo de la glucosa (Sokoloff, 1977). El metabolismo de la glucosa en cerebro se ha estudiado intensivamente tanto *in vitro* como *in vivo* (Pennington & Pentreath, 1987). Se concluyó que el cerebro es un poderoso tejido glucolítico, estableciéndose una

relación directa con la producción de energía, en particular ATP, como así también con la síntesis de aminoácidos y con la producción de compuestos reductores, necesarios para la síntesis de material nuclear.

La muerte neuronal causada por una reducción en la concentración de oxígeno o en el suministro de glucosa, o de ambos, ocurre como consecuencia de un incremento masivo de la concentración extracelular de aminoácidos neurotransmisores excitatorios, particularmente glutamato. Este aumento a niveles neurotóxicos genera cambios del potencial de membrana llevándolo a 0 mV, coincidente con cambios masivos en el gradiente de iones; como por ejemplo durante la hipoxia se producen eventos tempranos que generan la liberación de glutamato producto del aumento de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular (Figura R-IV.11.; Martin et al., 1994), este proviene del retículo, de la mitocondria o de ambos.

Además, la disminución del pH interno afecta los intercambiadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ o la ATPasa dependiente de Ca^{2+} . Estos procesos constituyen las distintas alteraciones en la transmisión excitatoria.

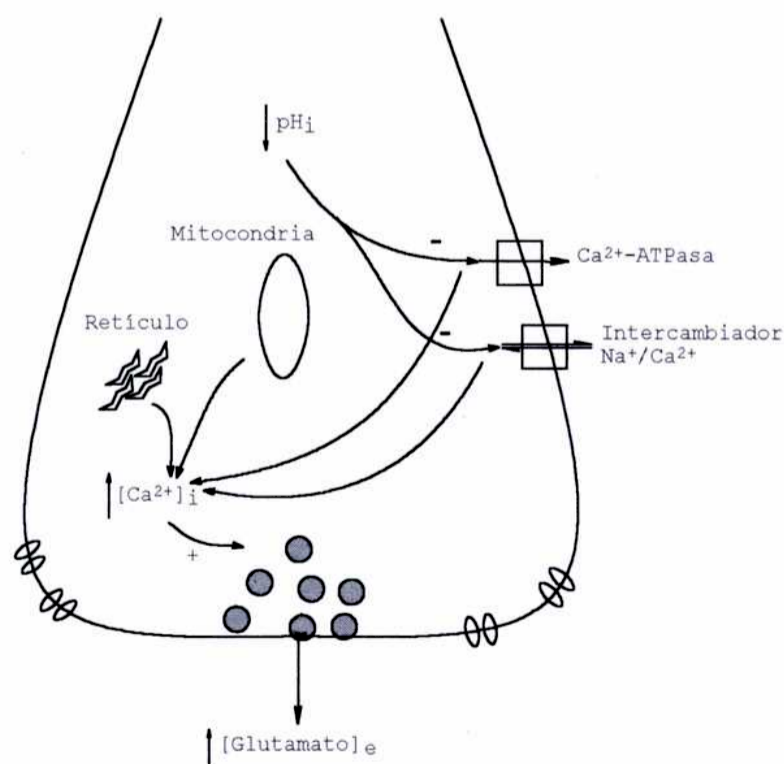


FIGURA R-IV.11.: Esquema representativo de los eventos tempranos posteriores a la privación de glucosa y/o oxígeno.
 $[\text{X}]_i$ = concentración intracelular; $[\text{X}]_e$ = concentración extracelular.

En estadios posteriores a la privación de glucosa y/o de oxígeno, la disminución de la concentración intracelular de ATP provoca un incremento de la cantidad de adenosina intra y extracelular. La adenosina conjuntamente con los niveles elevados de Ca^{2+} y de Mg^{2+} y la disminución del pH intracelular bloquean los canales de Ca^{2+} , llevando así a una falla en la transmisión excitatoria (Figura R-IV.12.; Martin et al., 1994).

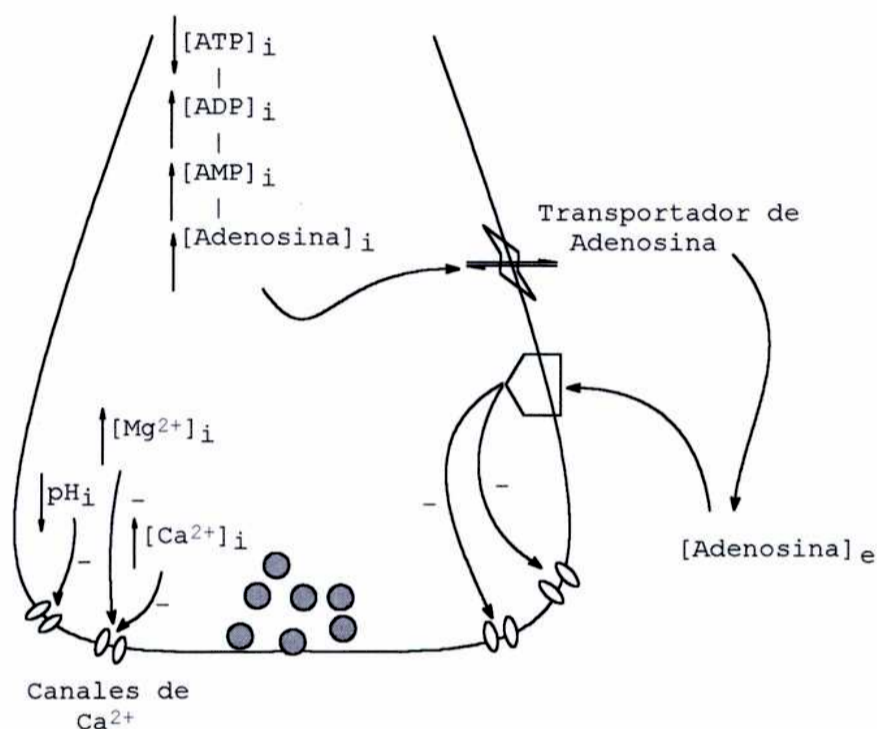


FIGURA R-IV.12.: Esquema representativo de los eventos tardíos posteriores a la privación de glucosa y/o oxígeno.
 $[X]_i$ = concentración intracelular; $[X]_e$ = concentración extracelular.

Existen evidencias que relacionan a los defectos energéticos con las enfermedades neurodegenerativas (Beal, 1992). Estudios de biopsias cerebrales mostraron un incremento en la captación de oxígeno consistente con un desacople del metabolismo energético mitocondrial (Sims et al., 1983) y una disminución en la actividad de las enzimas del ciclo de Krebs (Gibson, 1988); estas disfunciones también se observaron en enfermedades que implican una degeneración cerebelar.

Además se produce una disminución en las enzimas comprometidas en el transporte de electrones mitocondriales (DiMonte, 1992) teniendo en cuenta que su ADN es particularmente susceptible al daño por radicales libres (Wallace, 1992).

Para cumplir con la neurotransmisión se necesita una proporción significativa de la energía cerebral. Cerca del 90% del ATP necesario proviene de la fosforilación oxidativa (Erecinska & Dagani, 1990) pero la activación neuronal va acompañada de una estimulación de la glucólisis (Fox et al., 1988).

La mitocondria, ubicada principalmente en las terminales axonal y dendrítica, provee el ATP para diversas bombas que producen y mantienen el voltaje y el gradiente iónico a través de la membrana. El Na^+ es bombeado hacia afuera y el Ca^{2+} citoplasmático se mantiene en un nivel 1000 veces inferior al extracelular, por lo que debe ser permanentemente expulsado de la célula o almacenado en organelas como el retículo endoplasmático por medio de una ATPasa.

Un deterioro del sistema energético reduce los niveles de ATP modificando así el gradiente y produciendo fenómenos excitotóxicos, como por ejemplo el aumento intracelular de Ca^{2+} . Este incremento provoca daño mitocondrial (Nicotera et al., 1990), activación de fosfolipasas (Malis et al., 1990), proteasas y endonucleasas (Figura R-IV.13.; Beal et al., 1993).

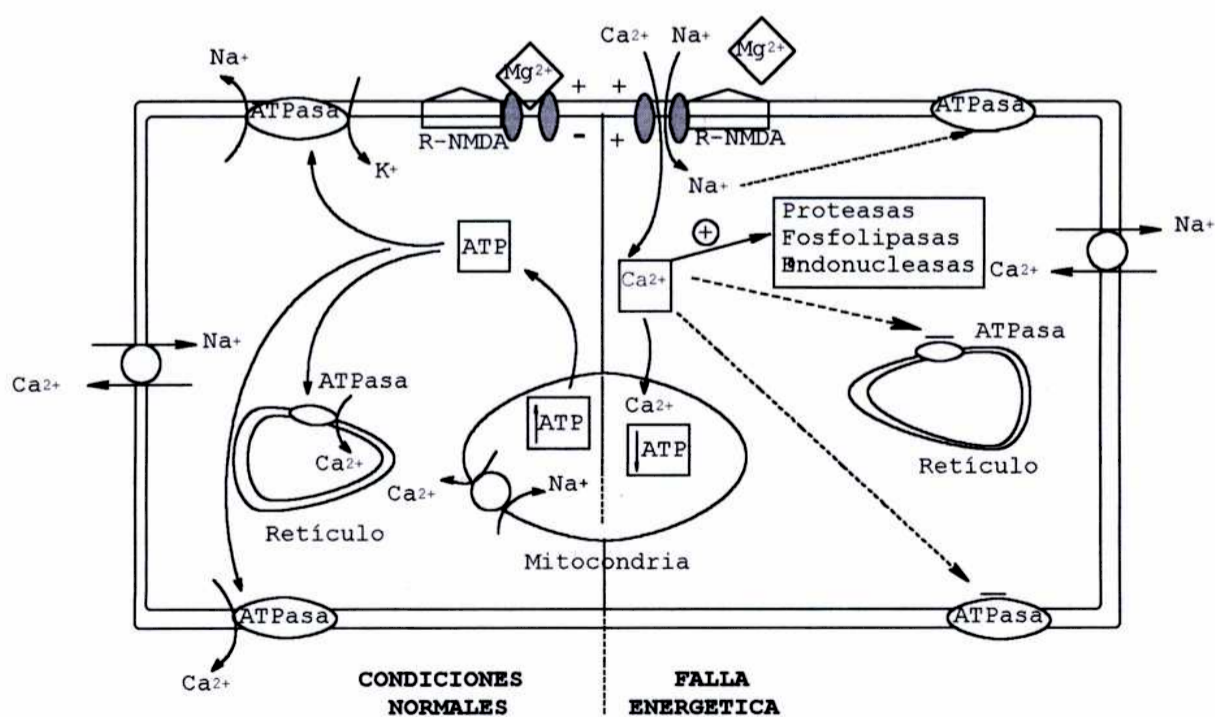


FIGURA R-IV.13.: Esquema comparativo del funcionamiento celular en condiciones normales y con fallas energéticas.

IV.4.. Bibliografía

- Beal, M.F. (1992) *Ann. Neurol.*, 31, 119.
- Beal, M.F.; Hyman, B.T. & Koroshetz, W. (1993) *TINS*, 16, 125.
- DiMonte, D.A. (1992) *Soc. Neurosci. Abstr.*, 18, 1488.
- Erecinska, M. & Dagoni, F. (1990) *J. Gen. Physiol.*, 95, 591.
- Fox, P.T.; Raichle, M.E.; Minutin, M.A. & Dence, C. (1988) *Science*, 241, 462.
- Gibson, G.E. (1988) *Arch. Neurol.*, 45, 836.
- Keele, A.C.; Neil, E. & Joels, N. (1982) en *Samson Wright's Applied Physiology*; Oxford University Press, Oxford, XIII, 133.
- Mallis, C.O.; Weber, P.C.; Leaf, A. & Bonventre, J. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8845.
- Martin, R.L.; Lloyd, H.G. & Cowan, A.I. (1994) *TINS*, 6, 251.
- Naftalin, R.J. & Rist, R.J. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, 1148, 39.
- Nalini, S.; Ahamed Ibrahim, S. & Balasubramanian, K.A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, 1147, 169.
- Nicotera, P.; Bellomo, G. & Orrenius, S. (1990) *Chem. Res. Toxicol.*, 3, 484.
- Pennington, A.J. & Pentreath, V.W. (1987) *J. Physiol.*, 82, 218.
- Percy, V.A.; Lamm, M.C. & Taljaard, J.J. (1981) *J. Neurochem.*, 36, 69.
- Rose, J.A.; Hellman, E.S. & Tschudy, D.P. (1961) *Metab. Clin. Exptl.*, 10, 511.
- Russell, V.A., Lamm, M.C. & Taljaard, J.J. (1982) *Neurochem. Res.*, 7, 1009
- Sims, N.R.; Bowen, D.M.; Neary, D. & Davidson, A.N. (1983) *J. Neurochem.*, 41, 1329.
- Sokoloff, L. (1977) *J. Neurochem.*, 29, 13.
- Taljaard, J.J.; Lamm, M.C.; Truter, L.; McCarthy, B.W.; Percy, V.A. & Neethling, A.C. (1981) *S. Afr. Med.*, 60, 180.
- Tschudy, D.P.; Welland, F.H.; Collins, A. & Hunter, G. (1964) *Metab. Clin. Exptl.*, 13, 396.
- Tschudy, D.P. (1974) en *Duncan's Diseases of Metabolism* [Bondy, P.K. & Rosenberg, L. (eds.)]; W.B. Saunders, Philadelphia; 775.
- Wallace, D.C. (1992) *Science*, 256, 628.
- Welland, H.S.; Hellman, E.S.; Gaddis, E.M.; Collins, A.; Hunter, G. & Tschudy, D.P. (1964) *Metab. Clin. Exptl.*, 13, 232.
- Wetterberg, L. (1976) en *Porphyryns in Human Diseases - Report of Discussions* [Doss, M. & Nawrocki, P (eds.)]; Falk, Freiburg; 191.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

	Página
I. Porfobilinógeno-Deaminasa de corteza cerebral y cerebelo de rata.	
Aislamiento y propiedades.....	191
II. Estudios sobre particulados de cerebelo.....	193
III. Efecto de especies reactivas de oxígeno sobre la porfirinogénesis.....	196
IV. "Efecto glucosa"	201
V. Bibliografía.....	204

I. PORFOBILINOGENO - DEAMINASA DE CORTEZA CEREBRAL Y CEREBELO DE RATA. AISLAMIENTO Y PROPIEDADES

El presente trabajo constituye el primer estudio realizado acerca de la enzima Porfobilinógeno-Deaminasa (PBG-D) de corteza cerebral y cerebelo de rata.

Los ensayos iniciales comprendieron una serie de experiencias tendientes a determinar las condiciones óptimas para la extracción y medición de la actividad enzimática de ambas fuentes.

La proteína se extrajo mediante la técnica de homogeneización en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 8,0, en una relación 1 : 10 (g de tejido : ml de buffer), concentrándose la actividad en la fracción sobrenadante (S).

Por calentamiento de la fracción S a 60°C durante 20 min, se obtuvo una preparación de PBG-D que formó 80 - 84% de URO I.

A partir de estas experiencias preliminares se desarrolló un procedimiento para lograr una fracción de PBG-D parcialmente purificada de ambas fuentes, que incluyó las siguientes etapas: homogeneización; centrifugación a 4500xg; ultracentrifugación a 105000xg; calentamiento a 60°C durante 20 min; fraccionamiento con sulfato de amonio en el rango 30 - 90% y cromatografía en Sephacryl S-200.

Se obtuvo una fracción de PBG-D de corteza cerebral purificada 206 veces con un rendimiento del 51% y una actividad específica de 1,9 nmoles URO I / mg proteína. Respecto a la PBG-D de cerebelo, se obtuvo una fracción purificada 81 veces con una actividad específica similar a la de corteza cerebral de 1,8 nmoles URO I / mg proteína.

Empleando la fracción desalada, se efectuaron mediciones de la actividad enzimática en función de la cantidad de proteína, del tiempo de incubación y de la concentración de sustrato.

La actividad de la PBG-D de ambas fuentes, expresada como formación de uroporfirina I, aumentó linealmente con la cantidad de proteína agregada al sistema de ensayo. En cuanto al tiempo de incubación, la formación de producto en corteza cerebral mostró un lag de 10 min, aumentando luego linealmente hasta las 2 h. En cambio en cerebelo el incremento fue lineal durante todo el tiempo ensayado. La curva de saturación por sustrato mostró un perfil hiperbólico, para la PBG-D de ambas fuentes, alcanzando el plateau a 50 μM de PBG.

En cuanto a los estudios cinéticos se encontró que la PBG-D presenta un comportamiento michaeliano, confirmado con gráficos de dobles recíprocas lineales y con coeficientes de Hill de 1. Las constantes cinéticas aparentes calculadas a pH 8,0 fueron 8,34 μM y 7,78 μM para el K_m y 0,179 nmoles URO I/h y 0,218 nmoles URO I/h para la $V_{m\acute{a}x}$ de corteza cerebral y cerebelo de rata respectivamente.

Por pasaje a través de una columna de Sephacryl S-200 se eluyó una fracción con actividad de PBG-D, a la cual le correspondió un peso molecular de 46700 \pm 4700 Da y 43000 \pm 4300 Da para corteza cerebral y cerebelo respectivamente.

El mantenimiento a -17°C de fracciones de PBG-D mostró que la enzima de ambas fuentes es estable frente en esas condiciones por lo menos durante 50 días. En cambio, las muestras guardadas en heladera a 4°C mostraron el conocido fenómeno de activación espontánea por estacionamiento, observándose incrementos en la actividad de un 80% a los 2 días para la PBG-D de corteza cerebral y de un 88% a los 6 días en cerebelo.

Se investigó además, el efecto del agregado de sulfamerazina (SMZ) y ácido fólico sobre la actividad enzimática.

Dado que la acción de estos compuestos varía con la concentración de sustrato, todas las experiencias se realizaron a concentraciones finales variables tanto de SMZ y ácido fólico como de PBG. La SMZ ejerció su conocido efecto inhibitorio a todas las concentraciones ensayadas (0 - 2,0 mM). Así se observó una inhibición del 48% en la formación de uroporfirina I en corteza cerebral, en incubaciones con 2,0 mM de SMZ y concentración saturante de PBG (60 μ M). En cerebelo, la misma alcanzó un 64% pero a concentración no saturante de PBG (14 μ M).

En cuanto al ácido fólico (0 - 1,0 mM) los resultados mostraron efectos duales para ambas fuentes. Se observó una activación significativa del 12 - 22% en incubaciones en presencia de 0,05 mM de ácido fólico y concentración saturante de PBG (60 μ M) mientras que a concentraciones mayores de ácido fólico (0,50 mM) el efecto fue inhibitorio (55% para 14 μ M de PBG) alcanzándose una inhibición total a 1,0 mM del efector. Estos resultados obtenidos fueron sumamente llamativos dado que hasta el presente sólo se han publicado efectos activantes o nulos para el ácido fólico.

II. ESTUDIOS SOBRE PARTICULADOS DE CEREBELO

Como se ha señalado, hasta el momento se han realizado muy pocos estudios acerca de la biosíntesis de porfirinas en cerebro. En los mismos se han empleado sistemas enzimáticos que suprimen las relaciones normales entre las neuronas y las células gliales o que no consideran los problemas de difusión, que surgen durante el intercambio de metabolitos con el medio de incubación.

En base a estos antecedentes, se resolvió emplear el sistema de particulados, descrito por Alperin et al. (1986) que resuelve las limitaciones antes citadas. El método consiste en la incubación de partículas de cerebelo, en presencia de

concentraciones fisiológicas de glucosa y niveles adecuados de disponibilidad del sustrato precursor, obteniéndose resultados altamente reproducibles.

La viabilidad de este modelo se estimó según el criterio de la preservación de la actividad biosintética (Carson *et al.*, 1981). Así, nuestros resultados mostraron una incorporación lineal de [4,5-³H]-leucina a proteína y una captación lineal de glucosa hasta las 4 h de incubación. No se observó efecto alguno sobre la incorporación de leucina por parte del sustrato precursor ALA a una concentración final de 1,0 mM.

Una vez conocida la viabilidad celular del sistema, se llevaron a cabo una serie de experiencias a fin de obtener información acerca de la captación de ALA y su metabolización a PBG y porfirinas, en función de la cantidad de proteína presente en el particulado, de la concentración de sustrato ALA agregado al medio y del tiempo de incubación.

Se observó una incorporación lineal de ALA al particulado hasta los 25 mg de proteína en incubaciones de 4 h en presencia de 1,0 mM de ALA. En estas condiciones, la captación de ALA fue de un 25% respecto a la cantidad inicial agregada al medio. La biosíntesis de PBG y la formación de porfirinas aumentaron linealmente hasta los 17 mg.

En incubaciones de 4 h empleando ALA hasta 4,0 mM, se observó que la captación de este sustrato ocurre por un proceso no saturable, mientras que la biosíntesis de PBG y la formación de porfirinas mostraron respuesta hiperbólica alcanzando el plateau a 1,0 mM y 1,5 mM de ALA respectivamente.

Estos resultados son sumamente novedosos pues demuestran que el cerebelo puede captar y acumular cantidades elevadas de ALA ($38,0 \pm 1,5$ nmoles/mg). Bajo ciertas condiciones (4 h de incubación en presencia de 0,2 mM de ALA) se obtuvo una acumulación de ALA ($1,8 \pm 0,5$ nmoles/mg) equivalente a la hallada

en hígado (1,77 nmoles/mg hígado seco) durante un ataque agudo de PAI (Sweeney et al., 1970).

Por otro lado, son también importantes los datos obtenidos acerca de la baja actividad de la PBG-D, dado que se ha propuesto para esta enzima, un rol regulatorio secundario en la biosíntesis del hemo (Elder, 1976).

Estudios en función del tiempo de incubación permitieron establecer que la desaparición del sustrato ALA del medio fue exponencial, alcanzando un 58% del valor inicial a las 4 h, mientras que la acumulación de ALA, la biosíntesis de PBG y la formación de porfirinas mostraron un incremento lineal a lo largo de las 4 h.

Es importante destacar que la integridad de la membrana se mantiene durante la incubación dado que no se detectó actividad enzimática capaz de metabolizar ALA o PBG en el medio, indicando además que no hay liberación de enzimas al mismo.

Por otro lado es de interés resaltar que existe liberación de PBG y porfirinas al medio, la cual aumenta con el tiempo de incubación. Con respecto a la distribución de estos metabolitos, el 60 - 65% del PBG total sintetizado se encontró en el medio mientras que el 56% del total de las porfirinas formadas se halló en el particulado.

Mediante HPLC se determinó la presencia de coproporfirina y protoporfirina en similares relaciones tanto en el medio como en el particulado. Se puede concluir así que este sistema es óptimo para el estudio de la biosíntesis de porfirinas, dado que se sintetiza protoporfirina en incubaciones empleando ALA como sustrato.

La presencia de ouabaina (10^{-7} - 10^{-3} M) en incubaciones de 4 h afectó la incorporación de ALA 1,0 mM al particulado, observándose la máxima inhibición (50%) a 10^{-3} M. Estos resultados

indicarían que la incorporación de ALA a las células es un proceso dependiente de energía.

Se investigó además la acción del agregado de concentraciones finales variables de SMZ (0,1 - 1,0 mM) en incubaciones de 4 h en presencia de 1,0 mM de ALA. Se obtuvo el conocido efecto inhibitorio para todas las concentraciones ensayadas, alcanzándose un 40% de inhibición en la formación de porfirinas a partir de 0,3 mM de SMZ.

Se estudió la acción del ácido fólico (0 - 0,5 mM) sobre la biosíntesis de porfirinas en incubaciones de 4 h empleando 1,0 mM de ALA como sustrato. Se encontró que el ácido fólico produjo efectos significativos tanto activantes (10%; $p < 0,005$) como inhibitorios (34%; $p < 0,005$) a bajas (0,025 mM) y altas (0,5 mM) concentraciones respectivamente. Este efecto dual y sus correspondientes porcentajes coinciden con nuestros hallazgos previos incubando la PBG-D de cerebelo con ácido fólico y sustrato.

III. EFECTO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO SOBRE LA PORFIRINOGENESIS

El tejido nervioso es especialmente vulnerable al ataque por radicales libres. Esto se debe principalmente a la presencia de membranas ricas en ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son sustratos para la peroxidación lipídica y a mecanismos antioxidantes de defensa relativamente deficientes. Así, la actividad de catalasa (CAT) es muy baja, las concentraciones de glutatión y vitamina E son reducidas y las cantidades de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSH-Px) son moderadas.

Además existen áreas del cerebro humano, como por ejemplo globus pallidus y sustancia nigra, que acumulan hierro, conocido

promotor de la formación de radicales, en concentraciones que exceden las halladas en hígado (Hallgren & Sourander, 1958).

Por otro lado se encontró que en distintos desórdenes mentales, las actividades de SOD, CAT y GSH-Px están elevadas (Michelson et al., 1977; Sinet et al., 1978; Agar & Hingston, 1980), relacionando los síntomas neuropsiquiátricos con la concentración de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} , que se generan durante la biosíntesis de neurotransmisores y que se requieren para la degradación de alucinógenos como la triptamina (Hirata et al., 1977).

Medeiros et al. (1982) han descrito que en pacientes con PAI, durante la crisis aguda la actividad de la SOD eritrocitaria está disminuida, en cambio la de CAT y de GSH-Px se encuentran elevadas. Esto supone que durante las crisis agudas la sobreproducción hepática de ALA conduciría a una mayor generación de ROS que no pueden ser secuestradas por la primer defensa antioxidante del organismo. Además, dado que las actividades de las enzimas "scavenger" en cerebro son bajas, el ALA en exceso circulante o sintetizado por este tejido podría ejercer su efecto citotóxico a través de la generación de las ROS.

Dada esta propiedad prooxidante que presenta el ALA, se evaluó en primer término la existencia de marcadores de daño celular, en especial los indicadores de lipoperoxidación. Empleando 1,0 mM de ALA se observó un aumento del 50% en la formación de dienos conjugados, en incubaciones de particulado de cerebelo durante 4 h.

En cuanto a las sustancias que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), su formación muestra incrementos con el tiempo de incubación (72% a 4 h) y con la concentración de ALA (127% a 4,0 mM de ALA), con respecto a controles incubados sin ALA.

En segundo lugar se observó que el agregado de distintos "scavengers" al medio de incubación previene la lipoperoxidación inducida por las ROS generadas por autooxidación del ALA. La SOD (50 U/ml), enzima secuestrante de $O_2^{\cdot-}$, es la que disminuye en mayor proporción la presencia de TBARS, tanto en función del tiempo de incubación como de la concentración de sustrato, posiblemente por constituir la primer defensa del organismo frente al ataque de ROS.

El efecto protector ejercido por la CAT (4,5 μ M) alcanzó valores constantes a los distintos tiempos de incubación en presencia de 1,0 mM de ALA, debido probablemente a una saturación de la enzima. En cambio, el efecto secuestrante del DMSO (150 mM) disminuyó con el tiempo hasta las 4 h, a causa de un incremento en la formación del radical OH^{\cdot} , altamente reactivo.

Sin embargo, la acción protectora ejercida por ambos "scavenger", CAT y DMSO, fue menos efectiva al aumentar la concentración de ALA hasta 4,0 mM, debido a una mayor formación de ROS y posiblemente a una saturación de los secuestrantes.

Por otra parte se analizó el efecto del agregado de los distintos "scavengers" al medio de incubación, sobre la captación de ALA, la biosíntesis de PBG y la formación de porfirinas.

Los resultados indicaron que la presencia de SOD (50 U/ml) en incubaciones de 4 h con 4,0 mM de ALA, produjo incrementos en la incorporación de ALA (45%), en la biosíntesis de PBG (170%) y en la formación de porfirinas (30%).

En cambio, el agregado de 4,5 μ M de CAT al medio de incubación no resultó modificación alguna en el proceso de incorporación de ALA pero sí, aumentó la biosíntesis de PBG (143% con 1,0 mM de ALA a 1 h) y la formación de porfirinas (160%, a 1,0 mM de ALA y 1 h de incubación).

Analizando la acción del DMSO (150 mM) en incubaciones de 4 h con 1,0 mM de ALA, se observaron incrementos del 20% en la incorporación de ALA, del 45% en la biosíntesis de PBG y del 25% en la formación de porfirinas. Estos resultados indicarían que las ROS generadas por autooxidación del ALA podrían actuar tanto a nivel del sistema transportador de ALA como por ataque directo sobre proteínas, por ejemplo ALA-D y PBG-D, o alterando su síntesis.

Desde una perspectiva clínica, habría que considerar la posibilidad del empleo de antioxidantes en el tratamiento de pacientes con PAI. Las estrategias adecuadas incluirían:

- a) compuestos diseñados para inhibir o disminuir la formación de ROS;
- b) "scavengers" que reaccionen directamente con las ROS e inhiban el desencadenamiento de reacciones en cadena;
- c) quelantes de hierro, que mantengan al mismo en forma no reactiva.

Ya se han indicado terapias neuroprotectoras empleando antioxidantes en desórdenes neurodegenerativos. El más empleado en humanos pero no el único, es el α -tocoferol, inhibidor de la peroxidación lipídica (Burton & Ingold, 1989), el cual presenta el inconveniente del tiempo (del orden de semanas) que se necesita para aumentar su contenido en cerebro (Muller & Goss-Sampson, 1990).

En pacientes con enfermedad de Parkinson se aplica el deprenil, potente inhibidor de la formación de peróxidos y por ende de la aparición de radicales $\text{OH}\cdot$. Es un selectivo inhibidor de la MAO-B (Olanov, 1993).

Entre los agentes quelantes, la desferrioxamina ha sido empleada exitosamente produciendo una disminución del daño oxidativo en numerosos modelos animales de patologías humanas (Halliwell, 1989).

Sin embargo, el máximo problema surge porque la mayoría de los antioxidantes no cruzaría la barrera hematoencefálica. Esto llevó al desarrollo en los últimos años, de la serie de 21-aminoesteroides con actividad antioxidante (Braugher et al., 1987), los cuales no solo inhibirían la peroxidación lipídica dependiente de Fe, sino que también actuarían a nivel de otras reacciones que involucren radicales libres (Sanchez-Ramos et al., 1992).

Estudios recientes describen el desarrollo de un agente que puede atrapar radicales *in vivo*, reaccionando con los mismos para formar aductos. Es el N-ter-butil- α -fenilnitrona (PBN). La administración diaria de PBN a gerbiles ancianos produjo una disminución en la cantidad de proteínas cerebrales oxidadas, un aumento en la actividad de la enzima glutamina-sintetasa de cerebro y una reducción en el número de errores durante un test de memoria (Floyd, 1991).

Estos hallazgos permiten evaluar la contribución de las ROS y de otros radicales libres en las distintas patologías humanas, dando lugar así, al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

En este modelo de particulado de cerebelo se intentó reproducir en forma aguda la situación que sufre un paciente porfírico durante una crisis, en la cual una concentración elevada de ALA circulante. Si bien los resultados aquí presentados indican que las ROS generadas por autooxidación de ALA estarían comprometidas en las manifestaciones fisiopatológicas y/o en el desencadenamiento de la PAI, no puede descartarse que haya otros procesos implicados, dado que esta enfermedad presenta una alta complejidad tanto clínica como bioquímica.

IV. "EFECTO GLUCOSA"

Existe un gran número de evidencias que el "efecto glucosa" (Tschudy et al., 1964; Marver et al., 1966) es de importancia fundamental en la aplicación de terapias y en la profilaxis de la porfiria aguda intermitente (PAI). A pesar de que no se conoce exactamente el mecanismo de acción de dicho efecto, está exhaustivamente documentado que la administración de glucosa produce una disminución de la excreción de los precursores ALA y PBG por orina y una mejoría clínica general, en pacientes con PAI (Doss et al., 1985).

Se ha propuesto que los carbohidratos actuarían inhibiendo la inducción de la enzima regulatoria ALA-S, por represión de su síntesis en hígado (Tschudy et al., 1964) y/o bloqueando el efecto de glucocorticoides (Moore et al., 1973; Goldberg, 1974).

Por otro lado, un descenso en el contenido de glucosa en sangre puede originar disfunciones a nivel cerebral. Así, la hipoglucemia producida por exceso de insulina o por insuficiencia hepática, está asociada con estados patológicos de amplio rango, desde disturbios sensoriales menores hasta el coma, dependiendo dicha severidad del grado y de la duración de la hipoglucemia (Clarke & Sokoloff, 1994).

De acuerdo con estos antecedentes y dado que la glucosa constituye el metabolito esencial para el normal funcionamiento del sistema nervioso central, se evaluó el efecto del ALA sobre la captación de glucosa (en concentración fisiológica de 1 g/l) empleando el sistema de particulado de cerebelo de rata.

Los resultados mostraron una desaparición lineal de glucosa del medio de incubación en función del tiempo, tanto en ausencia como en presencia de 1,0 mM de ALA, alcanzándose el nivel *in situ* de 0,5 g/l luego de 4 h.

Se observó que variando la concentración de ALA, la máxima inhibición alcanzada fue de un 50% a 4,0 mM de sustrato. Sin embargo, la presencia de 1,0 mM de ALA produjo un inhibición del 85% en la captación de glucosa a 1 h de incubación, variando la misma a un 26% a 4 h.

Se puede concluir que el ALA interfiere en la captación de glucosa por parte del particulado, posiblemente bloqueando el transportador o afectando la glucólisis. Estos resultados estarían de acuerdo con la hipótesis de que bajo ciertas condiciones, existen mecanismos regulados por glucosa asociados al transporte de este mismo azúcar (Klip et al., 1994). Así en cultivos primarios de neuronas de embrión de rata privados de glucosa por 48 h, se observó un incremento de 4 veces en el ARNm del GLUT3, indicando que la glucosa regula directamente la expresión génica del transportador (Nagamatsu et al., 1994).

Esto indica que la falta de glucosa activa efectivamente la velocidad de transcripción del transportador GLUT3 en neuronas, de ahí que la GLUT3 haya sido definida como una proteína inducible por stress, la cual protegería a la célula neuronal dañada de la privación de energía (Nagamatsu et al., 1994).

Considerando la posibilidad de que el ALA estuviera alterando la captación de glucosa, a través de la formación de ROS, se decidió estudiar el efecto de distintos "scavengers" sobre la misma en particulados de cerebelo de rata.

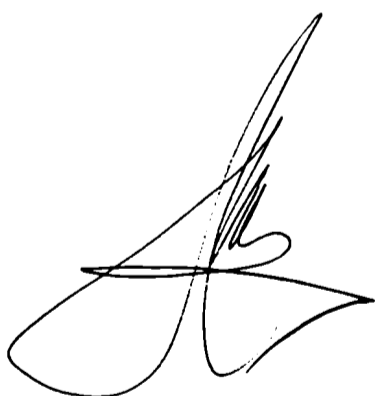
El agregado de los "scavengers" SOD (50 U/ml), CAT (4,5 μ M) y DMSO (150 mM) al medio no modificó significativamente la acción inhibitoria sobre la captación de glucosa ejercida por 1,0 mM de ALA, en función del tiempo de incubación.

Sin embargo, se encontró que existe una reversión significativa de dicho efecto sobre la captación de glucosa, en incubaciones de 4 h en presencia de ALA (1,0 - 4,0 mM) y de los "scavengers" CAT y DMSO.

Por lo tanto, las disfunciones que ocurren en la PAI no comprometen exclusivamente la presencia de ROS, confirmando así la complejidad de esta patología.

Por lo descripto es de esperar, que en pacientes con PAI, la combinación entre una elevada concentración de ALA circulante y el ayuno, generaría una disminución en la cantidad de glucosa en sangre, que desencadenaría las crisis agudas caracterizadas por desórdenes neurológicos. Estas alteraciones producen daños irreversibles que con la repetición intermitente, característica de esta enfermedad, agravan el cuadro clínico del paciente.

Si bien no se conoce el mecanismo por el cual la glucosa afecta las actividades de las enzimas, se observa, clínicamente, que una dieta rica en carbohidratos es efectiva en el tratamiento de los ataques de PAI. Seguramente la base fundamental de esta mejoría es el aumento en la concentración de carbohidrato circulante. Posiblemente a nivel del sistema nervioso, este incremento pueda revertir la acción ejercida por el ALA con el consecuente aumento de la actividad de las enzimas glucolíticas y formación del producto.

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom.A handwritten signature in black ink, featuring a complex, stylized design with multiple loops and a prominent vertical stroke.

V. BIBLIOGRAFIA

- Agar, N.S. & Hingston, J. (1980) *Med. J. Aust.*, 1, 556.
- Alperin, D.M.; Idoyaga-Vargas, V.P. & Carminatti, H. (1986) *J. Neurochem.*, 47, 355.
- Braughler, J.; Pregenzer, J.; Chase, R.; Duncan, L.; Jacobsen, E. & McCall, J. (1987) *J. Biol. Chem.*, 262, 10438.
- Burton, G. & Ingold, K.U. (1989) *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 570, 7.
- Carson, D.D.; Earles, B.J. & Lennarz, W.J. (1981) *J. Biol. Chem.*, 256, 11552.
- Clarke, D.D. & Sokoloff, L. (1994) en *Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects* [Siegel, G.J. (ed)]; Raven Press, New York; 5th Ed., 645.
- Doss, M.; Sixel-Dietrich, F. & Verspohl, F. (1985) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 23, 505.
- Elder, G.H. (1976) *Essays Med. Biochem.*, 2, 75.
- Floyd, R.A. (1991) *Science*, 254, 1597.
- Goldberg, M.L. (1974) *Life Sci.*, 17, 1747.
- Hallgren, B. & Sourander, P. (1958) *J. Neurochem.*, 3, 41.
- Halliwell, B. (1989) *Free Radic. Biol. Med.*, 7, 645.
- Hirata, F.; Ahnishi, T. & Hayaishi, O. (1977) en *Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen* [Hayaishi, O. & Asada, K. (eds.)]; University Park Press, Tokyo, 101.
- Klip, A.; Tsakiridis, T.; Marette, A. & Ortiz, P. (1994) *FASEB J.*, 8, 43.
- Marver, H.S.; Collins, A.; Tschudy, D.P. & Rechcigl, M. (1966) *J. Biol. Chem.*, 241, 4323.
- Medeiros, M.H.; Marchiori, P.E. & Bechara, E.J. (1982) *Clin. Chem.*, 28, 299.
- Michelson, A.M.; Puget, K.; Durosay, P. & Boumeau, J.C. (1977) en *Superoxide and Superoxide Dismutase* [Michelson, A.M.; McCord, J.M. & Fridovich, I. (eds.)]; Academic Press, New York; 467.
- Muller, D. & Goss-Sampson, M. (1990) *Crit. Rev. Neurobiol.*, 5, 239.
- Moore, M.R.; Paxton, J.W.; Beattie, A.D. & Goldberg, A. (1973) *Enzyme*, 16, 314.
- Nagamatsu, S.; Sawa, H.; Inoue, N.; Nakamichi, Y.; Takeshima, H. & Hoshino, T. (1994) *Biochem. J.*, 300, 125.
- Olanow, C.W. (1993) *TINS*, 16, 439.
- Sanchez-Ramos, J.; Song, S.; Mash, D. & Weiner, W. (1992) *J. Neurochem.*, 58, 328.
- Sinet, P.M.; Lejeune, J. & Jerome, H. (1978) *Life Sci.*, 24, 29.
- Sweeney, V.P.; Pathak, M.A. & Asbury, A.K. (1970) *Brain*, 93, 369.
- Tschudy, D.P.; Welland, F.H.; Collins, A. & Hunter, G. (1964) *Metabolism*, 13, 396.

ahora más que nunca

CARPE DIEM

