

Tesis de Posgrado

Porfiria y Cáncer : Antineoplásicos como agentes porfirinogénicos; influencia de tumores sobre el desencadenamiento de porfiria por hexaclorobenceno

Cochón, Adriana Cristina

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:

Cochón, Adriana Cristina. (1995). Porfiria y Cáncer : Antineoplásicos como agentes porfirinogénicos; influencia de tumores sobre el desencadenamiento de porfiria por hexaclorobenceno. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2779_Cochon.pdf

Cita tipo Chicago:

Cochón, Adriana Cristina. "Porfiria y Cáncer : Antineoplásicos como agentes porfirinogénicos; influencia de tumores sobre el desencadenamiento de porfiria por hexaclorobenceno". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2779_Cochon.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

PORFIRIA Y CANCER

*Antineoplásicos como agentes porfirinogénicos
Influencia de tumores sobre el desencadenamiento de
porfiria por hexaclorobenceno
Rol de las porfirinas en la localización de cáncer*

Adriana Cristina Cochón

Director de Tesis: *Dra. Leonor Carmen San Martín de Viale*

Codirector de Tesis: *Dra. Rosa Wainstok de Calmanovici*

Departamento de Química Biológica - FCEyN - UBA

**Tesis presentada para optar al Título de
Doctora de la Universidad de Buenos Aires**

1995

a mi familia

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento:

- ❖ a mi directora, Dra. Leonor C. San Martín de Viale, por haberme brindado la posibilidad de realizar este trabajo, por la libertad que me dio para investigar y por su continuo estímulo y apoyo.
- ❖ a mi codirectora, Dra. Rosa Wainstok de Calmanovici, por sus consejos y enseñanzas continuas en estos años de formación, por su aliento constante tanto en el laboratorio como en lo personal
- ❖ a la Dra. Rosa Bergoc por haber suministrado las ratas portadoras de tumores mamarios, por su asesoramiento científico y por haber estado siempre dispuesta a ayudar.
- ❖ al Dr. J. R. P. Cabral por haber suministrado los animales portadores de tumores hepáticos.
- ❖ a la Dra. Nélide Andrade por haber realizado los estudios histológicos.
- ❖ a las Dras. Y. Bonaparte y S. Klein por haber suministrado el tumor mamario de ratón (M3) y por su asesoramiento en la técnica de transplantes de tumores.
- ❖ a la Dra. Silvia Billi de Catabbi por su asesoramiento en el uso del HPLC y por su gran compañerismo y amistad.
- ❖ a la Sra. Carmen Aldonatti por su eficiente asistencia técnica y por muchos años de charlas, consejos y amistad.
- ❖ al Dr. Alberto Viale por su ayuda en todo lo concerniente con la computadora
- ❖ al Lic. Jean Claude Zenklusen y a la Srta. Carla Caputo por su colaboración en algunos experimentos.
- ❖ a Laura Matkovic' y Noemí Verrengia por las charlas luego de las jornadas de trabajo, por ser excelentes compañeras y amigas.

- ❖ a mis amigas de siempre Nora De Castro y Paula Alonso por haber estado siempre a mi lado brindándome su apoyo en los momentos difíciles
- ❖ a María del Carmen Ríos, María del Carmen Vila, Silvia Vacna, Claudia Martini, Carolina Minutolo, María Fernanda Braidot, Silvina Guidi, Cecilia Varone y Gabriela Chauffan por su compañerismo y su permanente disposición a ayudar.
- ❖ a todos los integrantes del Departamento de Química Biológica que me han acompañado a lo largo de estos años de trabajo
- ❖ a la Universidad de Buenos Aires por haberme otorgado las becas que permitieron concretar el presente trabajo
- ❖ a la Facultad de Ciencias Exactas por haberme dado el lugar de trabajo

Parte de los resultados presentados en esta tesis aparecieron en las siguientes publicaciones:

- ❖ *Synergistic effect of mammary tumors on the hexachlorobenzene - induced porphyria in rats.*
R. Wainstok de Calmanovici, **A. Cochón**, C. Aldonatti, R. Bergoc and L.C. San Martín de Viale.
Cancer Letters, **55** (1990) 67-73.
- ❖ *Influence of hepatic tumors caused by diethylnitrosamine on hexachlorobenzene induced porphyria in rats.*
R. Wainstok de Calmanovici, **A. Cochón**, J.C. Zenklusen, C. Aldonatti, J.R.P. Cabral and L.C. San Martín de Viale .
Cancer Letters **58** (1991) 225-232.
- ❖ *Sex comparison of heme pathway in rats bearing hepatic tumors*
R. Wainstok de Calmanovici, **A. Cochón**, C. Aldonatti, J.R.P. Cabral and L.C. San Martín de Viale
Tumori **77** (1991) 379-384.
- ❖ *Cyclophosphamide and its metabolite acrolein. Some studies on their porphyrinogenic action in 17 day old chick embryo.*
A. C. Cochón, L. C. San Martín de Viale and R. Wainstok de Calmanovici.
Comparative Biochemistry and Physiology **102C** (1992) 143-148
- ❖ *Erythrocyte uroporphyrinogen I synthase in rats treated with the hepatic carcinogen diethylnitrosamine*
R. Wainstok de Calmanovici, **A. Cochón**, C. Aldonatti, J.R.P. Cabral and L.C. San Martín de Viale
Acta Physiologica, Pharmacologica et Therapeutica Latinoamericana **45** (1995) 49-52

O fueron presentados en 7 Congresos Internacionales y en 14 Congresos Nacionales, recibiendo uno de ellos una Mención otorgada por el Colegiado Directivo de la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias en su sesión del 22 de abril de 1991.

INDICE

	Página
INTRODUCCION	
- CAPITULO I: ENZIMAS DEL CAMINO BIOSINTETICO DEL HEMO	1
I-1. Acido δ-aminolevúlico sintasa	3
I-2. Acido δ-aminolevúlico dehidrasa	7
I-3. Porfobilinógeno deaminasa-Uroporfirinógeno III sintasa	10
I-4. Porphirínógeno Carboxi-liasa	13
I-5. Coproporfirinógeno III oxidasa	16
I-6. Protoporfirinógeno oxidasa	18
I-7. Ferroquelatasa	20
- CAPITULO II: REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO EN EL HIGADO	22
II-1. Citocromo P450	22
II-2. Regulación de la actividad de ALA-sintasa hepática	26
- CAPITULO III: PORFIRIAS	29
III-1. Porfirias agudas	30
III-2. Porfirias no agudas	31
III-3. Metabolismo de porfirinas en otras enfermedades	31
III-4. Porfirias experimentales	32
III-4.1. Porfiria experimental por DDC	32
III-4.2. Porfiria experimental por AIA	34
III-4.3. Porfiria experimental por hexaclorobenceno	36
-CAPITULO IV: PORFIRIA Y CANCER	
IV-1. Relación entre tumores y disturbios en el metabolismo del hemo	39
IV-2. Antineoplásicos y camino metabólico del hemo	40
IV-2.1. Agentes alquilantes: ciclofosfamida, clorambucilo, melfalan y busulfano	41
IV-2.2. Agentes alquilantes no clásicos: procarbazona, dacarbazina y hexametilmelamina	44
IV-2.3. Flurouracilo y azatioprina	45

IV-3. Porfirinas en la detección y terapia del cáncer	45
- OBJETIVOS	51
- MATERIALES Y METODOS	
MATERIALES	52
Sustratos	52
Drogas	52
Equipos	53
METODOS	53
I- Tratamiento de los animales	53
I-1. Ratas	53
I-1.1. Ratas portadoras de tumores mamarios	53
I-1.2. Ratas portadoras de tumores hepáticos	54
I-1.3. Ratas tratadas con ciclofosfamida	55
I-2. Ratones	56
I-2.1. Ratones portadores de tumores	56
I-2.2 Ratones tratados con DDC y antineoplásicos	56
I-3. Embriones de pollo	56
II- Determinación de ALA, PBG y porfirinas en orina	57
II-1. Metodología	57
II-2. Reactivo de Ehrlich	58
II-3. Determinación de PBG	58
II-4. Determinación de ALA	58
II-5. Cálculos para determinar ALA, PBG y porfirinas eluidas de las columnas	58
III- Extracción de porfirinas en distintos tejidos	59
IV- Esterificación de porfirinas libres	60
V- Separación de porfirinas metil éster	60
V-1. Cromatografía en capa delgada por el método de Doss (288)	60
V-2. Cromatografía líquida de alta presión	60

VI- Medición de la actividad de ALA-sintasa	61
VI-1. Rata	61
VI-2. Embrión de pollo	61
VII- Determinación de la actividad de PBG-deaminasa	62
VII-1. Hepática y tumoral	62
VII-2. Eritrocitaria	62
VIII- Medición de la actividad de porfirinógeno carboxi-liasa	63
VIII-1. Preparación de amalgama de sodio	63
VIII-2. Preparación del uroporfirinógeno	63
VIII-3. Preparación enzimática, medio de incubación y expresión de resultados	64
IX- Medición de la actividad de protoporfirinógeno oxidasa	64
IX-1. Preparación del protoporfirinógeno	64
IX-2. Preparación enzimática, medio de incubación y expresión de resultados	65
X- Medición de la actividad de ferroquelatasa	65
X-1. Rata	65
X-2. Embrión de pollo	66
XI- Medición del contenido de citocromo P450 microsomal	67
XII- Estimación del contenido de hierro total	67
XIII- Recuento de leucocitos	68
XIV- Determinación de proteínas	68
XV- Tratamiento estadístico de los resultados	68

RESULTADOS

- CAPITULO I: EFECTO DE TUMORES MAMARIOS SOBRE LA PORFIRIA INDUCIDA POR HCB EN RATAS	69
I-1. Histopatología del tumor	69
I-2. Excreciones urinarias de ALA, PBG y porfirinas	72
I-3. Acumulación hepática de porfirinas	72
I-4. Contenido de porfirinas en tumores	74

I-5. Actividad de ALA-sintasa hepática	76
I-6. Actividad de PCL hepática	76
I-7. Actividades de ALA-sintasa y PCL en tumores	79
I-8. Discusión	81
 -CAPITULO II: INFLUENCIA DE TUMORES HEPATICOS EN EL CAMINO METABOLICO DEL HEMO Y EN LA INDUCCION DE PORFIRIA. COMPARACION ENTRE MACHOS Y HEMBRAS.....	84
II-1. Susceptibilidad de la cepa BDVI a la induccion de porfiria por HCB	85
II-2. El camino metabólico del hemo en ratas portadoras de tumores hepáticos. Comparación entre machos y hembras	87
II-2.1. Actividad de PBG-deaminasa eritrocitaria	87
II-2.2. Histopatología de los tumores	89
II-2.3. Excreción urinaria de ALA, PBG y porfirinas	91
II-2.4. Acumulación de porfirinas	91
II-2.5. Actividad de ALA-sintasa	94
II-2.6. Actividad de PBG-deaminasa	96
II-2.7. Actividad de PCL	94
II-2.8. Actividad de ferroquelatasa	100
II-2.9. Contenidos de citocromo P-450 y de hierro	102
II-3. Discusión	102
 - CAPÍTULO III: EFICACIA COMPARATIVA DE UROPORFIRINA I Y DEL DERIVADO DE HEMATOPORFIRINA COMO LOCALIZANTES DE TUMORES.....	109
III-1. Cinética de la distribución tisular de URO I y HPD.....	109
III-2. Discusión	114
 -CAPITULO IV: EFECTO DE VARIOS ANTINEOPLASICOS SOBRE EL CAMINO METABOLICO DEL HEMO	116
IV-1. Efecto de ciclofosfamida, clorambucilo y melfalan sobre la acumulación de porfirinas.....	116
IV-2. Efecto de busulfano, azatioprina y fluorouracilo sobre la acumulación de porfirinas y la actividad de ALA-sintasa	119
IV-3. Efecto de dacarbazina sobre la acumulación de porfirinas y la actividad de ALA-sintasa.....	122
IV-4. Efecto de procarbazina sobre la acumulación de porfirinas y la actividad de ALA-sintasa.....	124

IV-5. Efecto de hexametilmelamina sobre la acumulación de porfirinas y la actividad de ALA-sintasa	124
IV-6. Efecto de ciclofosfamida en ratas	127
IV-7. Contenido de porfirinas hepáticas en ratones luego de la administración de DDC y ciclofosfamida, hexametilmelamina o azatioprina	128
IV-8. Estudios sobre la acción porfirinogénica de ciclofosfamida y de su metabolito acroleína en embrión de pollo	129
IV-8.1. Naturaleza de las porfirinas acumuladas con ciclofosfamida	129
IV-8.2. Efecto <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de ciclofosfamida sobre la actividad de ALA-sintasa	129
IV-8.3. Actividad de ferroquelatasa y protoporfirinógeno oxidasa luego del tratamiento con ciclofosfamida	130
IV-8.4 Pretratamientos con fenobarbital o con SKF-525A	133
IV-8.5 Actividad de ALA-sintasa en función del tiempo luego de tratamientos con AIA, ciclofosfamida o acroleína	135
IV-8.6 Contenido de citocromo P450 en función del tiempo	135
IV-9. Discusión	138
CONCLUSIONES	142
REFERENCIAS	146
ABREVIATURAS	161

INTRODUCCION

CAPITULO I

ENZIMAS DEL CAMINO BIOSINTETICO DEL HEMO

El hemo es un componente esencial de varias hemoproteínas involucradas en las funciones de oxidación, hidropoxidación, transporte de electrones, unión y transferencia de oxígeno y metabolismo del triptofano.

En tejidos animales, el hemo es sintetizado en ocho pasos catalizados enzimáticamente, los cuales se distribuyen entre los compartimientos subcelulares mitocondria y citosol (Figura 1).

El primer paso de la biosíntesis del hemo consiste en la condensación de succinil coenzima A con glicina para formar el ácido δ -aminolevúlico (ALA). La reacción es catalizada por la enzima ALA-sintasa. El ALA sale de la mitocondria y dos moles de ALA se condensan para dar el monopirrol porfobilinógeno (PBG). Esta reacción ocurre en el citosol y es catalizada por la enzima ALA-dehidrasa. Luego, cuatro moléculas de PBG son condensadas de forma cabeza - cola por la enzima citosólica PBG-deaminasa originando hidroximetilbilano el cual es ciclado de forma regioespecífica por la enzima uroporfirinógeno III (UROgen III) sintasa dando el producto uroporfirinógeno III. El hidroximetilbilano también puede ciclarse espontáneamente en ausencia de actividad enzimática originando uroporfirinógeno I. El uroporfirinógeno I y sus metabolitos no son biológicamente activos y se acumulan sólo en estados patológicos. El uroporfirinógeno tiene ocho sustituyentes carboxilados, un carboximetil y un carboxietil en cada uno de los cuatro anillos pirrólicos. La porfirinógeno carboxi-liasa (PCL), una enzima citosólica, decarboxila cada uno de los cuatro sustituyentes carboximetil tanto del uroporfirinógeno III como del isómero I dando el isómero de coproporfirinógeno correspondiente. El siguiente paso es la decarboxilación oxidativa de dos de los cuatro grupos carboxietilos del coproporfirinógeno III para formar grupos vinilos. Este paso es catalizado por la enzima coproporfirinógeno oxidasa. La actividad enzimática está localizada en la superficie externa de la membrana interna de la mitocondria y es específica para el isómero III. El producto de la reacción, el protoporfirinógeno IX, es oxidado enzimáticamente por la enzima protoporfirinógeno oxidasa, una proteína integral de la membrana interna de la mitocondria, a protoporfirina IX. El último paso en la biosíntesis del hemo, la inserción de hierro al estado ferroso en la protoporfirina IX es catalizado por la enzima ferroquelatasa (1).

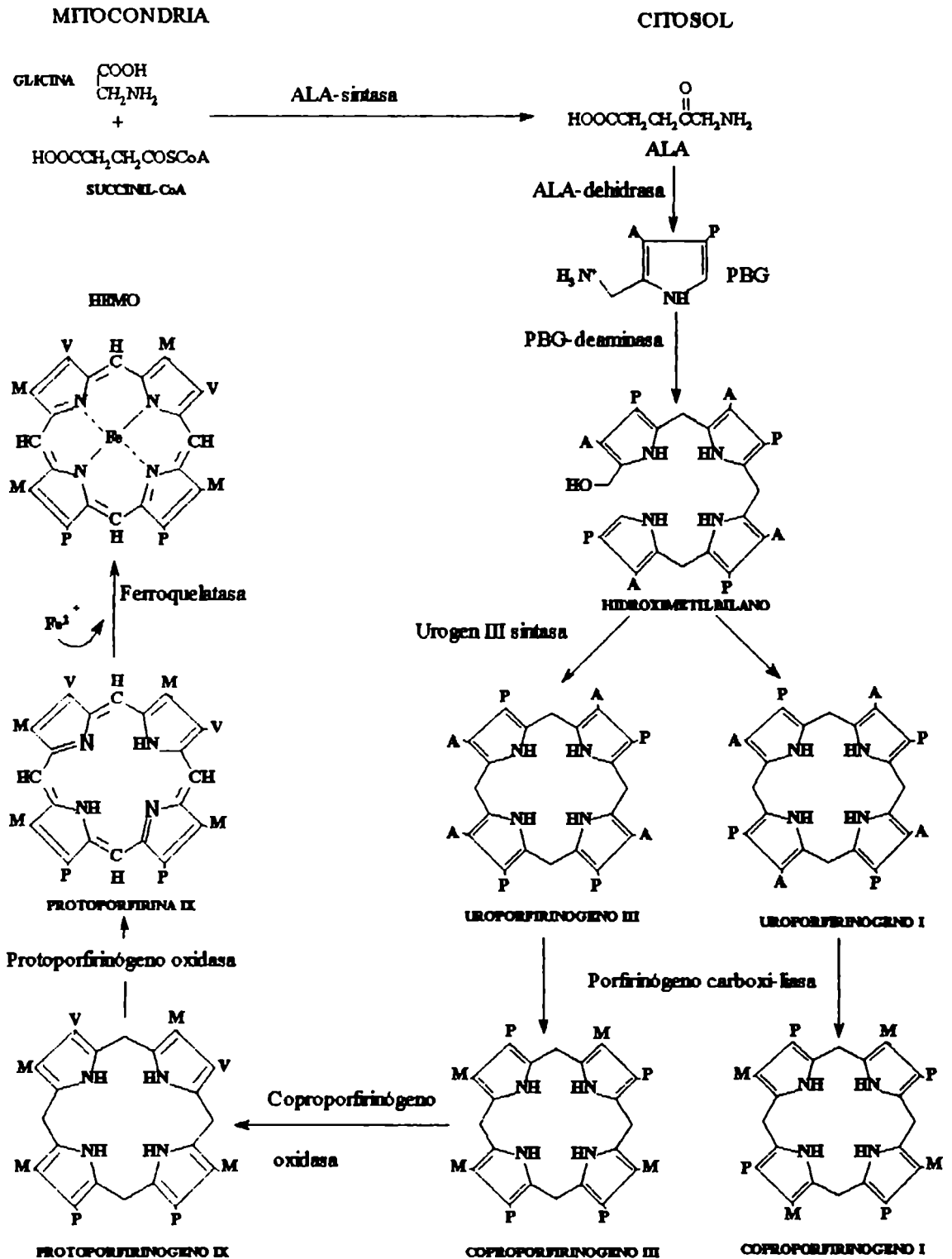


Figura 1: Camino metabólico del hemo.

ALA: ácido δ-aminolevulínico, PBG: porfobilinógeno, Urogen III: uroporfirinógeno III,
 A: -CH₂COOH, P: -CH₂CH₂COOH, M: -CH₃ y V: -CH=CH₂

I-1. Acido δ -aminolevúlico sintasa (ALA-sintasa)

La primera reacción en el camino biosintético del hemo, esto es la condensación de glicina y succinil CoA para formar ALA, es catalizada por la enzima mitocondrial ALA-sintasa (Succinil CoA:glicina C- succinil transferasa, EC 2.3.1.37), (Figura 2).

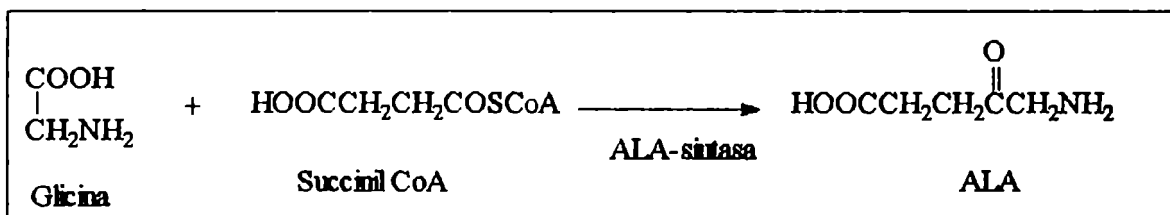


Figura 2: La reacción catalizada por ALA-sintasa

Esta actividad enzimática fue identificada por primera vez en la bacteria fotosintética *Rhodopseudomonas spheroides* (2) y en partículas obtenidas de pollos anémicos (3) describiéndose también la implicancia del fosfato de piridoxal como cofactor de la enzima. Posteriormente, la actividad de ALA-sintasa fue demostrada en gran variedad de especies y tejidos (4-10).

En la Figura 3 puede verse el mecanismo de acción propuesto para ALA-sintasa (11). Primero una glicina forma una base de Schiff con el fosfato de piridoxal que está unido a la enzima. Luego un protón es removido del átomo de carbono metilénico de la glicina. Posteriormente, se produce la condensación de succinil CoA formándose el ácido α amino β cetoalópico con la pérdida de CoA. Por último el ácido α amino β cetoalópico se decarboxila para dar el producto final ALA.

Todas las células animales sintetizan su propio hemo para los citocromos mitocondriales y otras hemoproteínas celulares. Por lo tanto ALA-sintasa presumiblemente existe en todas las células animales aeróbicas cumpliendo una función "housekeeping" (12). Los tejidos más estudiados en cuanto a la biosíntesis del hemo han sido sin duda el tejido eritroide y el hepático ya que debido a los requerimientos de hemoglobina, aproximadamente el 85% de la síntesis de hemo corporal la llevan a cabo las células eritroides (12) y la mayor parte de la restante síntesis del hemo se lleva a cabo en el hígado para suplir el grupo prostético hémico del citocromo P450 microsomal.

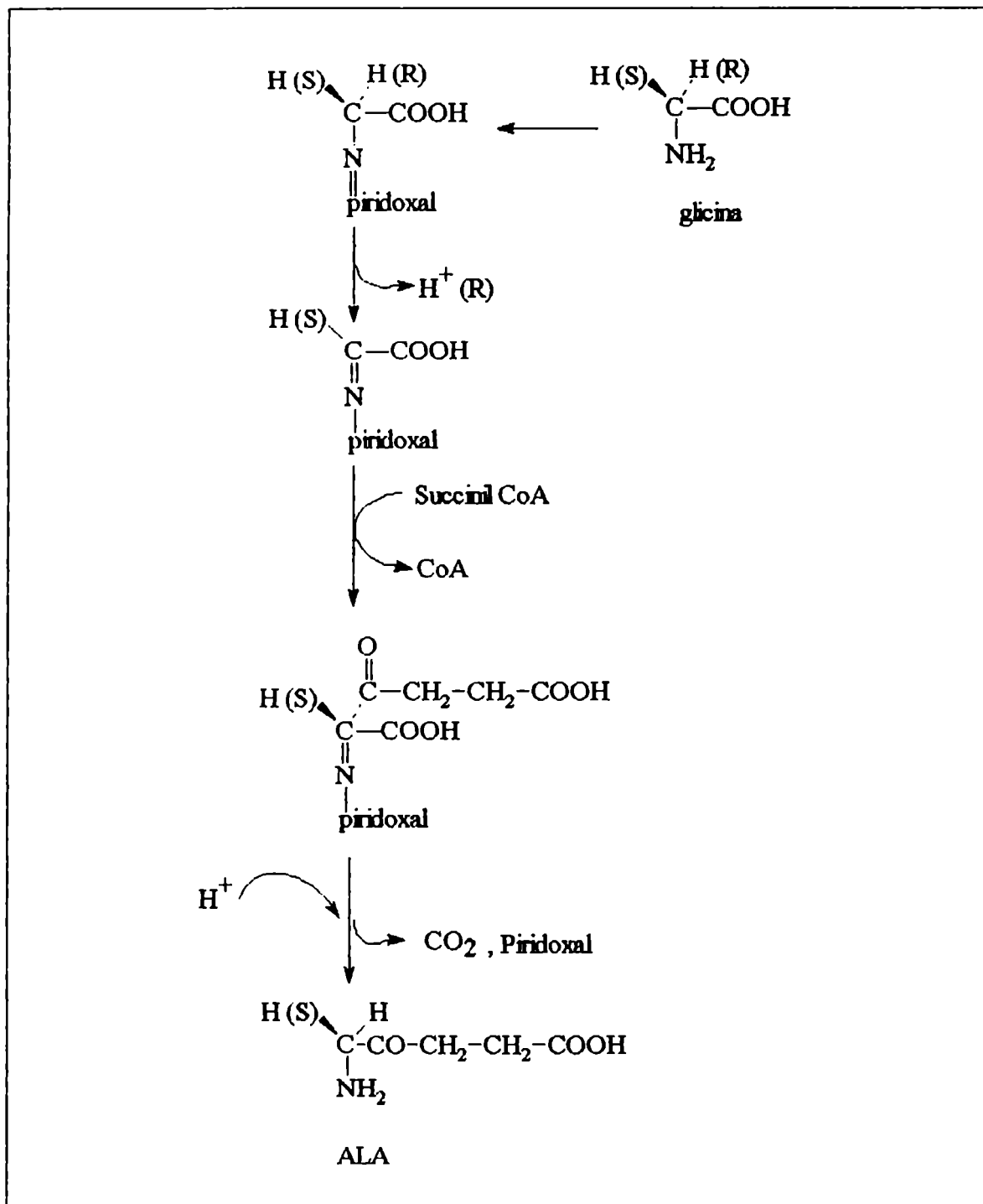


Figura 3: Mecanismo de acción propuesto para ALA-sintasa

Se sabe que, en el hígado, la actividad de ALA-sintasa está reprimida por hemo (13,14) mientras que en las células eritroides la actividad es refractaria o se ve incrementada por el hemo (15). También hay diferencias en los pesos moleculares (16) y en las propiedades catalíticas (17) e inmunológicas (18) entre las isoenzimas de ALA-sintasa en los dos tejidos. Se demostró que existen dos genes separados para ALA-sintasa, uno que codifica para la forma eritroide (ALAS-E) (19) y otro que codifica para la forma hepática o no específica de ALA-sintasa (ALAS-N) (20). En la rata, ALAS-E es la enzima clave para aportar grandes cantidades de hemo para la síntesis de hemoglobina en el hígado fetal mientras que ALAS-N aporta el hemo para el sistema de citocromos P450 en el hígado fetal y en el hígado de las ratas recién nacidas y adultas (21). En células humanas, el gen para ALAS-N fue asignado al cromosoma 3p21 (22) mientras que el gen para ALAS-E fue asignado al cromosoma X, Xp21-Xq21 (22). Se vio que la organización del gen de ALAS-N en la rata es muy similar a la del gen para ALAS-E en el ratón consistiendo ambos en once exones lo que sugiere que ambos genes derivan de un único gen ancestral probablemente compuesto por once exones (21). Fujita y col. (23) demostraron, trabajando con células murinas de eritroleucemia transformadas por el virus Friend, que los genes que codifican para las dos isoenzimas de ALA-sintasa se encuentran bajo un control separado.

Como la enzima se encuentra en pequeñas cantidades y es muy inestable, su purificación es muy difícil. Los pesos moleculares descriptos para ALA-sintasa varían dependiendo de la fuente y del método de preparación. Asimismo la enzima puede formar agregados con otras proteínas (24). Sin embargo varios grupos pudieron purificar la enzima a homogeneidad ya que a pesar de que el nivel de esta enzima es normalmente muy bajo, su actividad puede ser incrementada significativamente en hígado y riñón como consecuencia de la administración de drogas (25). El grupo de Elliot trabajando con mitocondrias de hígado inducido por drogas encontraron un peso molecular mínimo de 68000 para embrión de pollo (26) y de 70000 para rata (27) para cada subunidad ya que la enzima es un dímero de subunidades idénticas. Con la obtención de un clon de cDNA se vio que la enzima mitocondrial de hígado de embrión de pollo consiste en 579 aminoácidos con un peso molecular estimado en 63.903 y la de hígado de rata consiste en 586 aminoácidos con un peso molecular de 64.956. Se observó que hay una homología total de un 79% entre la enzima mitocondrial hepática de rata y de embrión de pollo (12).

Estudios con embriones de pollo y ratas mostraron que ALA-sintasa hepática es sintetizada en polisomas citoplasmáticos libres como un precursor

mas largo que es procesado en la transferencia a la mitocondria dando origen a la forma mitocondrial madura final. La enzima citosólica de hígado de rata consiste en un dímero de dos subunidades idénticas de peso molecular 51000 y dos subunidades catalíticamente inactivas de peso molecular 79000 y 120000 (28).

ALA-sintasa mitocondrial parcialmente purificada de hígado de conejo, rata y cobayo presenta valores de K_m en el rango de 5 a 19 mM, 60 a 200 μ M y 1 a 10 μ M para glicina, succinil CoA y fosfato de piridoxal respectivamente (24, 29-32). La V_{max} de la enzima mitocondrial purificada de hígado de ratas es de 2000 nmol/h por mg de proteína (33) y es de más de 20000 nmol / h por mg de proteína para hígado de embrión de pollo (34).

La vida media de ALA-sintasa mitocondrial es corta: 34 minutos en hígado de rata fetal (35), 70 minutos en el hígado de rata adulta (36) y 180 minutos en células de hígado de embrión de pollo en cultivo (37) pero la vida media de la enzima citosólica es aún mas corta: sólo 20 minutos para hígado de rata (36). Así, ALA-sintasa tendría una de las más rápidas velocidades de recambio de proteínas mitocondriales y su vida media es mucho más corta que el promedio de vida media de proteínas mitocondriales en general (aproximadamente 5 días) (38).

Muchas plantas, algas y bacterias producen ALA por un camino alternativo que no involucra glicina ni succinil CoA. En lugar de estos compuestos utiliza glutamato, glutamina o α cetoglutarato. Se han postulado dos mecanismos distintos para la formación de ALA. Uno de ellos involucra al ácido γ - δ -dioxovalérico (DOVA) como intermediario, el cual por acción de una transaminasa (DOVA-transaminasa) origina ALA (Figura 4a). En el otro mecanismo, el glutamato es activado por unión al tRNA y luego es reducido a glutamato 1-semialdehído (GSA). La enzima GSA 2,1-aminomutasa convierte el GSA en ALA (Figura 4b) (39,40).

En células de mamíferos se halló una reacción similar a la catalizada por la DOVA transaminasa (41) aunque el rol de esta enzima en la regulación de la formación de hemo en tejidos animales aún no ha sido elucidado.

a) glutamato $\rightarrow$ α -cetoglutarato $\rightarrow$ DOVA $\rightarrow$ ALA

b) glutamato + tRNA^{GLU} $\rightarrow$ glutamil-tRNA $\rightarrow$ GSA $\rightarrow$ ALA

Figura 4: Formación de ALA en plantas superiores.

I-2. Acido δ -aminolevulico dehidrasa (ALA-dehidrasa)

ALA-dehidrasa (ALA-hidrolasa, porfobilinógeno sintetasa, EC 4.2.1.24) es una enzima citosólica que ha sido caracterizada en animales (42), plantas (43) y bacterias (44). La enzima cataliza la condensación de dos moléculas de ALA con pérdida de dos moléculas de agua para formar el monopirrol PBG (Figura 5).

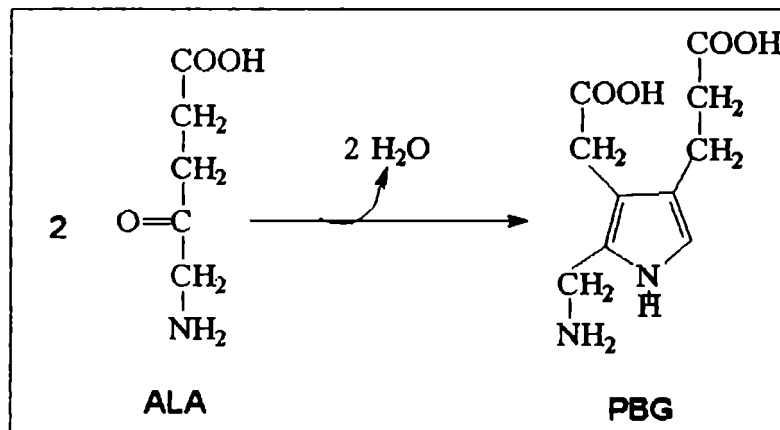
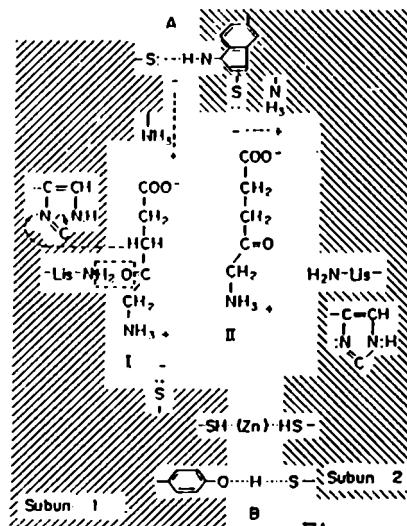


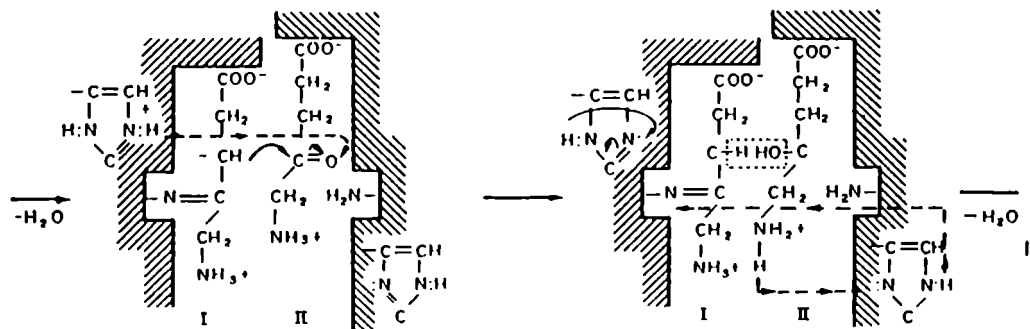
Figura 5: La reacción catalizada por ALA-dehidrasa

El mecanismo enzimático según lo postularon Nandi y Shemin en 1968 para *Rhodopseudomonas spheroides* puede ser resumido de la siguiente forma: una molécula de ALA forma una unión covalente con la enzima a través de la formación de una base de Schiff entre el grupo ϵ -amino de un residuo lisina y el grupo ceto del ALA. El carbanión así formado participa luego de una condensación aldólica con una segunda molécula de ALA con la pérdida de una molécula de agua (45). La molécula de ALA que inicialmente se une al ALA-dehidrasa es la que forma el sustituyente propiónico del PBG (46). Si bien el mecanismo de acción propuesto por Nandi y Shemin básicamente aún tiene validez, en 1978 Batlle y Stella (47) lo modificaron teniendo en cuenta las evidencias experimentales obtenidas a posteriori (Figura 6).

ALA-dehidrasa purificada de eritrocitos de mamíferos (48) y de hígado (49,50) muestra su máxima actividad en presencia de Zn y compuestos sulfhidrúlicos como β -mercaptoetanol, cisteína, glutatión reducido y ditioneitol. La

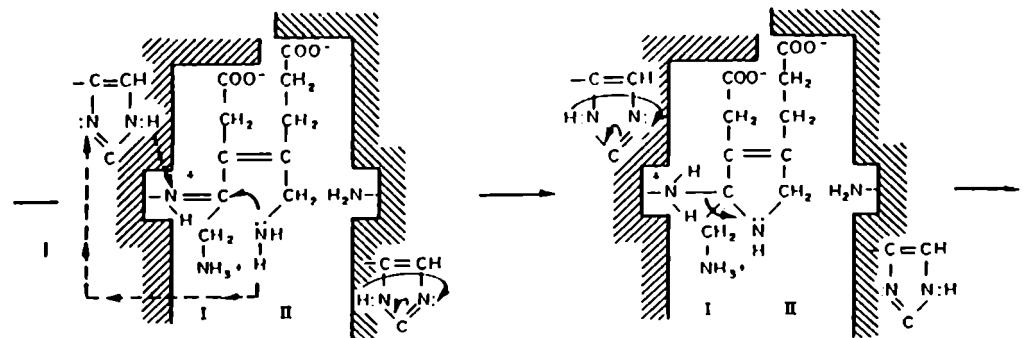


Etapa I



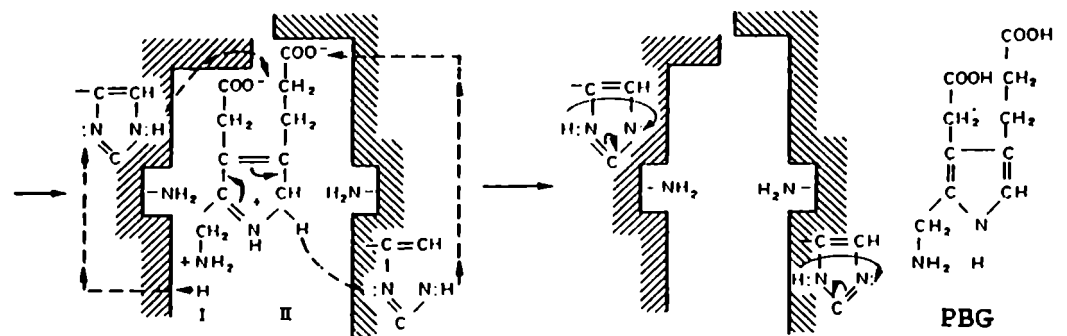
Etapa II

Etapa III



Etapa IV

Etapa V



Etapa VI

Etapa VII

PBG

Figura 6: Mecanismo de acción del ALA-dehidrasa.

Etapas I: el dímero funcional formado por las dos subunidades 1 y 2 une dos moléculas de ALA (I y II). A y B representan los sitios de unión entre subunidades.

Etapas II a VI: pasos intermedios en la síntesis de PBG.

Etapas VII: reordenamiento final para regenerar la enzima libre y dar el producto final PBG.

actividad enzimática se pierde rápidamente cuando se oxidan sus grupos sulfhidrílicos ya sea por oxígeno, por inhibidores de grupos sulfhidrilos o por remoción del Zn por un quelante como el EDTA (50). La enzima proveniente de bacterias no requeriría Zn para su actividad aunque recientemente se reportó que ALA-dehidrasa de *Escherichia coli* es una Zn^{2+} metaloenzima y que posee características similares a la bovina (51).

La enzima purificada de hígado bovino contiene en su sitio activo dos residuos cisteína, dos residuos histidina y un Zn. Los residuos de histidina parecerían estar involucrados en la unión del Zn al sitio catalítico de la enzima (50).

ALA-dehidrasa es una enzima compuesta por múltiples subunidades de idéntico peso molecular. El peso molecular de la enzima purificada de diversas fuentes es de 250.000 a 280.000. La enzima de hígado bovino (52) y de eritrocitos humanos (53) consiste en ocho subunidades idénticas. Ambas enzimas poseen 8 átomos de Zn por octómero y contienen fosfato de piridoxal. La enzima purificada de distintos tejidos de mamíferos es muy similar siendo el K_m para ALA de 1 a $4 \times 10^{-4} M$ y V_{max} de 20 a 24 $\mu mol/h$ por mg de proteína (38).

Plomo (54), ácido levulínico (55), hemina (56) y succinilacetona (57) son inhibidores de esta enzima.

Análisis de Southern blot del DNA genómico de distintas cepas de ratas indican que hay múltiples copias del gen que codifica para ALA-dehidrasa. Se aislaron dos tipos de clones a partir de una biblioteca de rata Sprague-Dawley. Uno sería el gen expresado mientras que el otro contendría un pseudogen procesado. El genoma de rata es inusual ya que no se han detectado pseudogenes en otros mamíferos, incluyendo hombre, gorila, orangután, conejo, ratón y hamster (58).

I-3. Porfobilinógeno deaminasa - Uroporfirinógeno III sintasa

Porfobilinógeno deaminasa (hidroximetilbilano sintasa, porfobilinógeno amonio-liasa, E.C. 4.3.1.8) cataliza la polimerización de cuatro moléculas de porfobilinógeno (PBG) en forma cabeza-cola para generar hidroximetilbilano. Este tetrapirrol lineal es convertido en uroporfirinógeno III por la enzima uroporfirinógeno III sintasa (isomerasa, cosintetasa, E.C. 4.2.1.75). En ausencia de esta última enzima sólo se forma uroporfirinógeno I y por esto frecuentemente se

llama a la enzima PBG-deaminasa como uroporfirinógeno I sintasa. Sin embargo, la enzima no produce directamente uroporfirinógeno como producto sino que forma un tetrapirrol de cadena recta que puede ciclarse espontáneamente para dar el tetrapirrol macrocíclico uroporfirinógeno I (Figura 7).

PBG-deaminasas han sido aisladas de un amplio rango de fuentes procariotas y eucariotas. Entre las deaminasas procarióticas, la proveniente de *R. sphaeroides* es una de las mejor caracterizadas (59). La enzima también ha sido aislada de mamíferos (60 - 62) y de plantas (63). Todas las deaminasas parecen ser enzimas monoméricas con pesos moleculares de 33.000 a 44.000.

La enzima pura de hígado de rata tiene un K_m de 17 μM y una V_{max} de 29.4 unidades/mg (62).

PBG-deaminasa está codificada por un gen con dos promotores distintos. El reordenamiento diferencial de los transcritos obtenidos a partir de los promotores lleva a dos especies distintas de mRNA que se traducen en dos isoformas de la proteína. Una isoforma es ubicua mientras que la otra es específica del tejido eritroide (64).

Se ha reportado la aislación de cosintetasa de eritrocitos humanos (65), *Euglena gracilis* (66) y de hígado de rata (67). Cosintetasa obtenida a partir de una cepa recombinante de *E. coli* mostró ser un monómero de peso molecular 28.000 con un K_m para el sustrato, pre-uroporfirinógeno, de 5 μM , similar a lo obtenido en otras fuentes. La enzima es sensible al calor y posee cuatro grupos tioles (68).

Para estudiar el problema de la formación de uroporfirinógeno III, se utilizó [^{13}C]PBG y el curso de la reacción fue monitoreado por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^{13}C . Este método permitió la identificación de un intermediario liberado por la deaminasa que es sustrato de la cosintetasa (69). La estructura de este intermediario resultó ser 2-(hidroximetil)bilano (70). La secuencia de formación de uroporfirinógeno III a partir de PBG fue aceptada entonces como una reacción catalizada secuencialmente por las dos enzimas: la deaminasa que forma el 2-(hidroximetil)bilano a partir del PBG y la cosintetasa que cicla el 2-(hidroximetil)bilano con inversión del anillo D para dar uroporfirinógeno III. La formación del uroporfirinógeno I se atribuyó a una rápida ciclación química del 2-(hidroximetil)bilano ($t_{1/2} = 4$ min. a 37°C) en ausencia de cosintetasa. A altas concentraciones de proteína se detectó formación de uroporfirinógeno I sin detección de 2-(hidroximetil)bilano probablemente por estabilización de especies

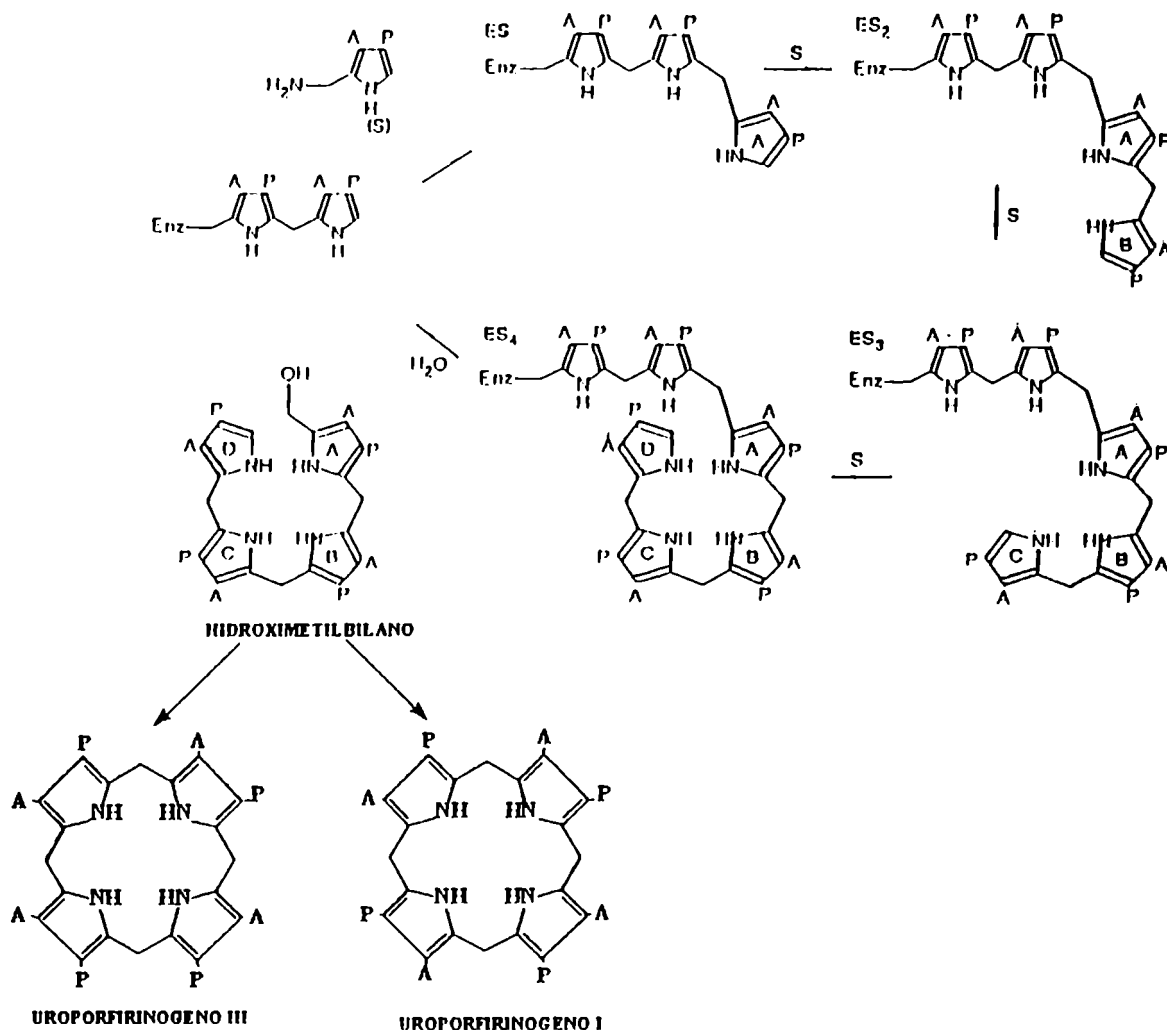


Figura 7: Formación de uroporfirinógenos III y I a partir de PBG.

A: $-\text{CH}_2\text{COOH}$ y P: $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$.

La holoenzima porfobilinógeno deaminasa (E) está compuesta por la apoenzima (Enz) unida a un grupo prostético llamado cofactor dipirrometano. Las cuatro moléculas de sustrato (S) marcadas con las letras A, B, C y D se adicional secuencialmente al cofactor unido a la holoenzima para dar los complejos intermedios ES, ES₂, ES₃ y ES₄. La liberación del producto hidroximetilbilano sucede por hidrólisis permaneciendo el cofactor dipirrometano unida a la enzima.

azafulveno liberadas por la enzima antes de que se forme el 2-(hidroximetil)bilano (71).

En condiciones normales, no se liberan al medio de incubación intermediarios entre PBG y el tetrapirrol ya que la deaminasa sintetiza el tetrapirrol a partir de PBG por un mecanismo que involucra a la enzima unida a especies intermediarias (72). Estas especies unidas a la enzima fueron identificadas incubando deaminasa de eritrocitos humanos con [^3H]PBG, lo que permitió la detección por electroforesis de la formación de isómeros cargados correspondientes a los pirilmetanos unidos covalentemente a la enzima (60). Se identificaron cuatro bandas de proteínas marcadas atribuibles a los intermediarios mono-, di-, tri- y tetrapirrol.

Estudios con la enzima proveniente de *Rhodopseudomonas sphaeroides* establecieron que se forma una unión covalente entre la enzima y el primer sustrato unido (59). La extensión de estos estudios usando la enzima aislada de cepas recombinantes de *Escherichia coli* indicaron que la deaminasa contiene un cofactor dipirrometano unido a la cisteína 242 y es a este cofactor al que se unen covalentemente los sustratos (73,74).

Recientemente se obtuvo evidencia, por mutagénesis sitio dirigida del gen Hem c de *E. coli*, de la participación del aspartato 84 como un grupo catalítico en el sitio activo de la PBG deaminasa. La sustitución del aspartato 84 por alanina o asparragina lleva a una proteína incapaz de catalizar la formación del preuroporfinógeno pero que podría ensamblar el cofactor dipirrometano (75).

I-4. Porfirinógeno Carboxi-liasa (PCL)

Porfirinógeno carboxi-liasa (uroporfinógeno decarboxilasa, uroporfinógeno carboxi-liasa, E.C. 4.1.1.37) es una enzima citosólica que cataliza la remoción secuencial de los cuatro grupos carboxilados de las cadenas acético del uroporfinógeno para dar coproporfinógeno con la formación de los intermediarios hepta-, hexa- y penta-carboxiporfinógenos (Figura 8) (76-78).

La enzima utiliza sólo porfirinógenos como sustrato y no sus correspondientes porfirinas (76, 79) y es capaz de decarboxilar los cuatro isómeros del uroporfinógeno. La decarboxilación de los isómeros del uroporfinógeno ocurriría con distintas velocidades. Según algunos autores la reacción ocurre más

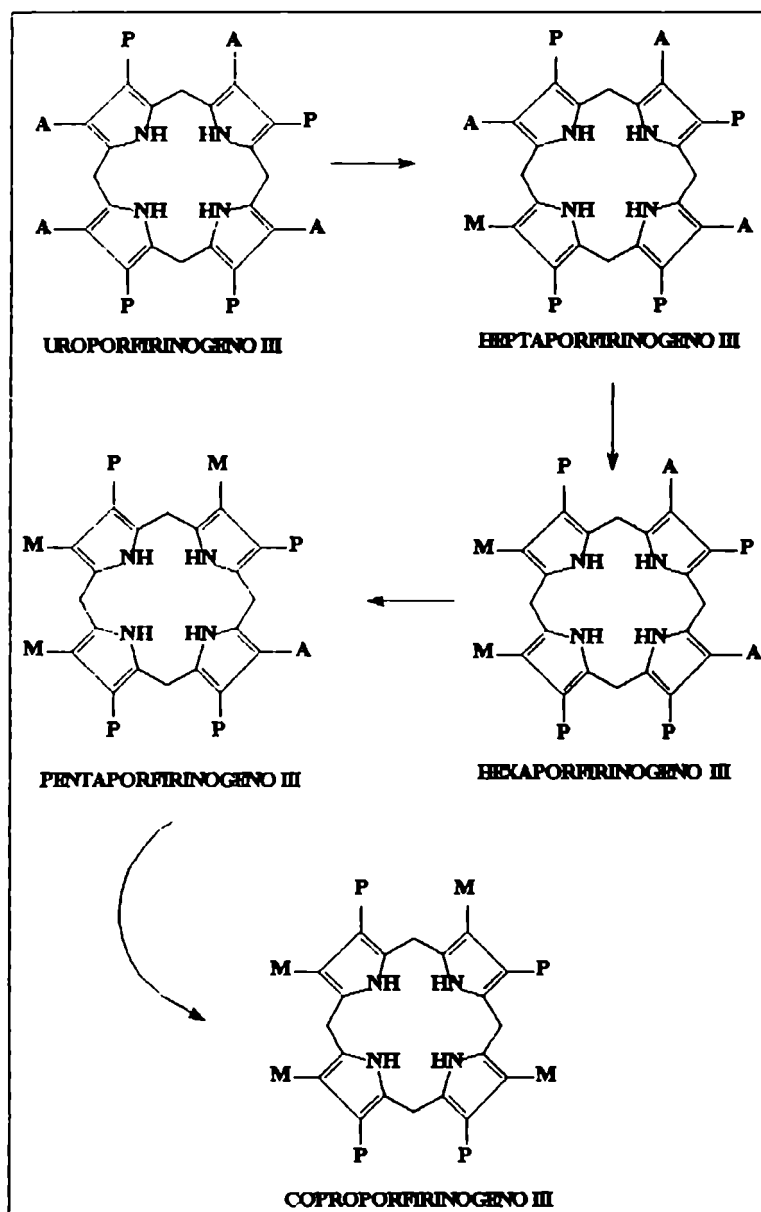


Figura 8: Formación de coproporfirinógeno a partir de uroporfirinógeno.
A: $-\text{CH}_2\text{COOH}$; M: $-\text{CH}_3$; P: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$

rápidamente con el isómero III seguido por los isómeros IV, II y I (76, 80). San Martín de Viale y col. (81) determinaron que las velocidades de reacción son uroporfirinógeno IV > III > II > I y Romeo y Levin y Kushner y col. (82, 83) encontraron igual velocidad de reacción para los isómeros III y I.

El orden de decarboxilación del uroporfirinógeno III es dependiente de la concentración del sustrato y bajo condiciones fisiológicas sigue el sentido de las agujas del reloj, comenzando por el grupo acetato del anillo D. Sin embargo, a

altas concentraciones de sustrato la decarboxilación es al azar, como ocurre en el caso del uroporfirinógeno I (78, 84).

Se ha postulado que la reacción ocurre en dos etapas bien definidas: la primera es la remoción del primer carboxilo del anillo D del uroporfirinógeno III para dar firiaporfirinógeno III y la segunda es la remoción lenta de los otros carboxilos (77, 85-87).

PCL ha sido altamente purificada de eritrocitos humanos (88) y de hígado bovino (89) y parcialmente purificada de reticulocitos de conejo (76), eritrocitos de pollo (77, 85, 90), *Rhodopseudomonas spheroides* y *Rhodopseudomonas palustris* (91, 87), hojas de tabaco (92), bazo de ratón (82) y de hígado de rata (93).

La enzima tiene un peso molecular de 41.000 a 58.000 dependiendo de la fuente y el método utilizado y un pH óptimo de 6,8 (82, 87, 89). A pH 6,8 y en eritrocitos humanos los valores de K_m para uroporfirinógeno I y III y pentaporfirinógeno I y III son 0,80; 0,35; 0,07 y 0,05 μM respectivamente (88). Los valores de K_m obtenidos en hígado de rata son mayores: 3,24 y 2,68 μM para uroporfirinógeno III y pentaporfirinógeno III respectivamente (94).

PCL de varias fuentes, incluyendo humano y bacterias, parece ser un monómero (87, 95) mientras que la de eritrocitos de ave sería un dímero (90).

Aún no se conoce el mecanismo de acción enzimático ni el número de sitios catalíticos pero se han propuesto modelos que sugieren de uno a cuatro sitios activos (77, 88, 89, 96). Recientemente, Chelstowska y col. (97) trabajando con alelos HEM 12 mutantes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* encontraron evidencias que sugerirían un único centro activo.

Romeo y col. (98) clonaron y secuenciaron un cDNA que codifica para la PCL humana. Confirmaron que la proteína tiene aproximadamente 10% de residuos aromáticos. También encontraron seis residuos de cisteína, tres de los cuales estarían en un grupo de ocho aminoácidos. Como las cisteínas parecen ser parte del sitio activo de la enzima, ellos proponen que este grupo de ocho aminoácidos estaría en el sitio activo. Billi de Catabbi y col. (99) trabajando con enzima de hígado de rata encontraron que histidina estaría involucrada en el sitio activo de al menos la primera decarboxilación concluyendo que en el sitio activo habría un ambiente positivamente cargado que sería reconocido por los grupos carboxilados negativamente cargados de los porfirinógenos. Por otro lado, arginina, si bien está relacionada con la actividad enzimática, no está directamente involucrada en el sitio de unión del uroporfirinógeno III (100).

En el hombre, PCL está codificada en un sólo locus del brazo corto del cromosoma 1 (101).

I-5. Coproporfirinógeno III oxidasa

Coproporfirinógeno III oxidasa (E.C. 1.2.3.3) y protoporfirinógeno IX oxidasa (E.C. 1.3.3.4) son enzimas que actúan en tandem y en mamíferos están asociadas a estructuras mitocondriales (102). Coproporfirinógeno oxidasa cataliza la decarboxilación oxidativa a grupos vinilos de dos grupos propionato en la posición 2 y 4 del coproporfirinógeno III para producir protoporfirinógeno IX mas dos moléculas de CO_2 (Figura 9). Jackson y col. (103) sugieren que el primer paso consiste en la decarboxilación oxidativa del coproporfirinógeno a harderoporfirinógeno en el sitio activo. Subsiguientemente el harderoporfirinógeno formado sufre una rotación en contra del sentido de las agujas del reloj para colocar el segundo grupo propionato en posición de ser decarboxilado, luego de lo cual abandona la superficie enzimática. La reacción es una decarboxilación oxidativa y es de resaltar que en organismos aeróbicos sólo el oxígeno molecular puede actuar como aceptor de electrones. En organismos anaeróbicos ha sido detectada actividad anaeróbica de coproporfirinógeno oxidasa en preparaciones libres de células de *Pseudomonas*, *Rhodopseudomonas spheroides*, *R. palustris*, levadura y una cepa de *Chromatium* (104).

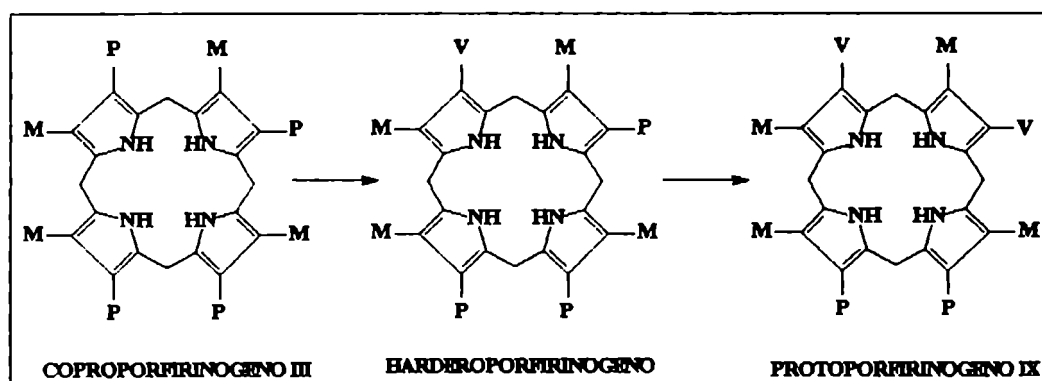


Figura 9: La reacción catalizada por la coproporfirinógeno oxidasa

M: $-\text{CH}_3$; P: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$; V: $-\text{CH}=\text{CH}_2$

Battle y col. (105) publicaron un estudio detallado de la enzima purificada a homogeneidad a partir de mitocondria de hígado de rata, con una masa molecular relativa de 80.000. La enzima tiene un alto grado de especificidad no mostrando actividad con coproporfirinógeno I, con otros

porfirinógenos o con hematoporfirina IX. Sin embargo, Porra y Falk (106) reportearon que coproporfirinógeno IV podría servir como sustrato.

Grandchamp y col. (107) y Elder y Evans (108) encontraron que gran parte de la actividad enzimática en el hígado de rata se encontraba en el espacio intermembrana de la mitocondria aunque un 20% de la actividad estaba firmemente asociada con la cara externa de la membrana interna de la mitocondria (107). Mas aún, cuando se compararon mitocondrias sonicadas con mitocondrias intactas, se encontró un incremento de tres veces en la actividad específica sin modificación en el valor de K_m para coproporfirinógeno ($0,16 \mu M$) (107). El mismo tipo de modificación cinética fue observado por Yoshinaga y Sano (109) quienes purificaron a homogeneidad la enzima coproporfirinógeno oxidasa a partir de mitocondria bovina y describieron un incremento en la actividad específica de dos a cinco veces cuando se ensayó la actividad en presencia de varios fosfolípidos y detergentes no iónicos. Sin embargo, bajo estas condiciones experimentales, se modificaron tanto la velocidad máxima como el K_m para coproporfirinógeno ($K_m = 48 \mu M$ para la enzima no tratada versus $18 \mu M$ en la presencia de fosfolípidos). Estos resultados sugieren una interacción funcional entre la enzima y la membrana mitocondrial.

En contraste con la localización mitocondrial en células de hígado, la enzima de levadura está localizada en el citosol (110). Esta enzima fue purificada a aparente homogeneidad y se vio que era un homodímero con una masa molecular por subunidad de 35 kDa. La enzima purificada de levadura contiene dos átomos de hierro pero su función en la reacción catalítica no fue demostrada. Se aisló el gen para la enzima de levadura y se encontró que codifica para una proteína de 328 aminoácidos con una masa molecular calculada de 37.673 Da (111). La expresión del gen estaría negativamente regulada por hemo y oxígeno. Cuando se caracterizó el gen para una coproporfirinógeno oxidasa anaeróbica de *R. sphaeroides* (112, 113), el análisis de secuencia reveló que la masa molecular de la enzima es de 34.185 Da pero la secuencia de aminoácidos deducida no mostró homología con la enzima de levadura. Recientemente se clonó la enzima de ratón (114). El análisis de secuencia reveló que la coproporfirinógeno oxidasa de ratón posee 354 aminoácidos, una masa molecular de 40.647 y una secuencia líder de 31 aminoácidos lo que da una proteína madura de 323 aminoácidos con un peso molecular de 37.255. Como el peso molecular de la enzima bovina había sido estimado por filtración por geles en 74.000 (109), la enzima de mamíferos sería un homodímero. La comparación de la secuencia aminoacídica de la enzima de ratón con la de levadura muestra un 52% de identidad. Recientemente se clonó

la coproporfirinógeno oxidasa humana y se vio que la enzima humana tenía un 86% de identidad con la enzima de ratón (115).

I-6 Protoporfirinógeno oxidasa

El último paso común en la biosíntesis del hemo y la clorofila es la oxidación (remoción de 6 protones y 6 electrones) de protoporfirinógeno IX a protoporfirina IX. Esta reacción puede ocurrir no enzimáticamente pero es catalizada por una enzima de membrana denominada protoporfirinógeno oxidasa (E.C. 1.3.3.4). En este paso, los caminos para la síntesis de hemo y clorofila divergen ya que quelatasas específicas insertan hierro o magnesio en la protoporfirina IX para formar precursores de hemo o clorofila (Figura 10) (116).

Los experimentos de Jackson y col. (117, 118) proveyeron evidencia directa de que "in vivo" la oxidación del protoporfirinógeno a protoporfirina ocurre enzimáticamente.

En 1975, Poulson y Polglase (119) purificaron la enzima aislada de mitocondria de *Saccharomyces cerevisiae* y la caracterizaron. Un año después, Poulson (120) purificó parcialmente y caracterizó la enzima a partir de mitocondria de hígado de rata. Encontró que la enzima es similar en muchos aspectos a la de levadura. La enzima de hígado de rata es específica para protoporfirinógeno IX con un K_m aparente de 11 μM , un pH óptimo de 8,6-8,7 y un peso molecular determinado por Sephadex G-200 de aproximadamente 35.000. La actividad enzimática es inhibida por una alta concentración de sales y temperaturas superiores a 45°C. El oxígeno es esencial para su actividad y presenta grupos monotiol.

La protoporfirinógeno oxidasa de hígado de rata no se sintetiza en ribosomas mitocondriales (121) a diferencia de lo descrito por Poulson y Polglase (122) para la enzima de levadura.

Tratamientos con tripsina y sulfonato de diazobenceno indican que la protoporfirinógeno oxidasa está anclada dentro de la bicapa lipídica de la membrana interna de la mitocondria. Así, el protoporfirinógeno tiene igual acceso al sitio activo de la enzima a partir de ambos lados de la membrana interna y su transformación a protoporfirina no parece ser dependiente de energía (123).

En plantas, las protoporfirinógeno oxidasas están presentes en plástidos y mitocondria (124). Recientemente, Matringe y col. (116) describen que la actividad de protoporfirinógeno oxidasa en cloroplastos está unida a membrana

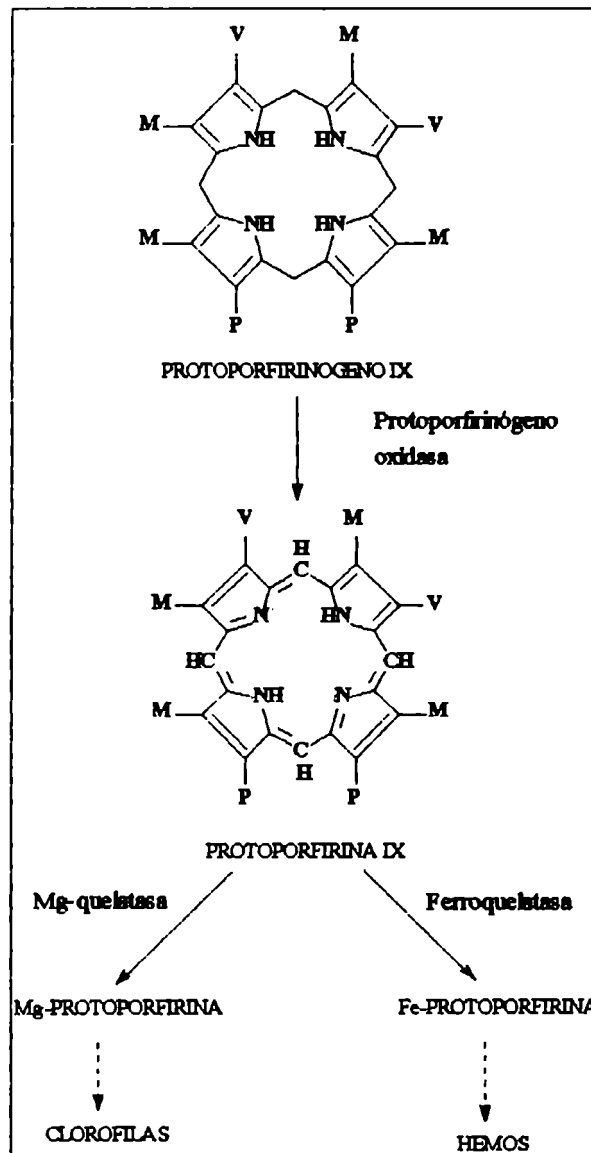


Figura 10: Protoporfirinógeno oxidasa es la última enzima del camino común a la síntesis de clorofila y hemo.

y está asociada a las dos membranas cloroplásticas. En estos últimos años, el estudio de las características de la protoporfirinógeno oxidasa en vegetales ha tenido un gran empuje debido al hecho de que es la enzima blanco de los herbicidas tipo difenileter.

Recientemente se informó la clonación del gen que codifica para la protoporfirinógeno oxidasa de *Escherichia coli* (125).

I-7. Ferroquelatasa

El último paso en la biosíntesis del hemo es la inserción de un átomo de hierro al estado ferroso en el macrociclo de la protoporfirina IX (Figura 11). Ferroquelatasa (protohemo-ferroliasa, hemo sintetasa, E.C. 4.99.1.1), la enzima que cataliza este paso, se encuentra en eucariontes unida a la membrana interna de la mitocondria (126) mientras que en procariotes está asociada a la membrana citoplasmática (127). Harbin y Dailey (128) trabajando con la enzima proveniente de hígado bovino, encuentran que la enzima atraviesa la membrana interna de la mitocondria y está orientada de tal forma que el sitio activo se encuentra en el lado de la membrana que mira hacia la matriz mitocondrial. Posteriormente Dailey (129) propuso que el sitio activo sería un bolsillo hidrofóbico similar en su naturaleza al sitio de unión de hemo encontrado en varias hemoproteínas.

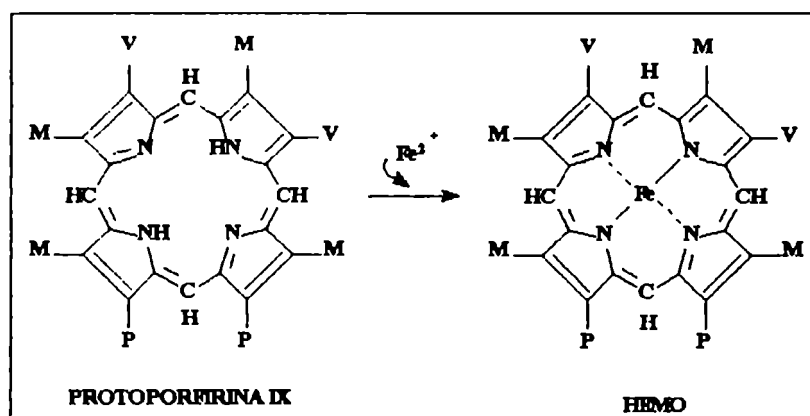


Figura 11: La reacción catalizada por la enzima ferroquelatasa

La enzima ha sido purificada de diversas fuentes incluyendo hígado bovino (130), hígado de rata y ratón (131, 132), eritrocitos de pollo (133) y levadura (134). También se ha reportado una purificación parcial a partir de hígado humano (135).

Los cDNA de levadura (134), ratón (136) y humano (137) han sido aislados y secuenciados y el gen para la ferroquelatasa humana ha sido localizado en el cromosoma 18q22 (138).

El peso molecular para la enzima de hígado bovino ha sido estimado en 40.000 (130) aunque se han reportado pesos moleculares de hasta 230.000

(139). Probablemente estos valores tan altos sean artefactos de la técnica que debido a bajas concentraciones de detergentes faciliten la formación de agregados. El tamaño funcional de la ferroquelatasa hepática bovina fue estudiado por Straka y col. (140) usando análisis de inactivación por radiación. Ellos encontraron que la unidad funcional requerida para la actividad enzimática era de 82 ± 13 kDa aunque la unidad estructural tiene una masa de 40 ± 10 kDa y por lo tanto propusieron un modelo para la enzima compuesto por dos subunidades de 40 kDa cada una.

Con respecto al mecanismo de acción enzimático, se ha postulado que la enzima bovina utiliza un mecanismo de reacción secuencial en el cual el hierro se une antes que la porfirina y el hemo se libera antes que la liberación de los dos protones (130). Según Dailey y col. (141) la unión del hierro sería a través de grupos sulfhidrúlicos vecinales y la unión de la porfirina involucra residuos arginina. Ríos de Molina y col. (142) encontraron evidencias que sugieren que el fosfato de piridoxal podría ser un cofactor de la enzima de hígado de rata. Teniendo en cuenta que el fosfato de piridoxal usualmente funciona como quelante de iones bivalentes, estos autores proponen que dicho cofactor podría estar involucrado en el sitio de unión del Fe^{2+} o por lo menos en el acercamiento del Fe^{2+} al sitio activo de la enzima. Recientemente, Abbas y Labbe-Bois (143) postularon, estudiando mutantes de levadura, que la región de ferroquelatasa involucrada en el sitio de unión de los sustratos consistiría de un segmento central rico en residuos hidroxilados que formaría parte del dominio de unión al metal, flanqueado por regiones ricas en residuos aromáticos o alifáticos que serían los involucrados en las interacciones hidrofóbicas con la porfirina.

La enzima de mamíferos utiliza sólo porfirinas dicarboxiladas de la serie isomérica IX y no utiliza sus correspondientes metil ésteres (144). Puede utilizar como sustratos proto-, meso-, deuterio- y hemato-porfirina pero sustituyentes con carga o voluminosos en la posición 2,4 hacen que pierda reactividad (130, 144). Tampoco es sustrato específica con respecto al hierro ya que también puede quelar Co^{2+} , y Zn^{2+} (145, 126). Otros metales divalentes como Mn^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} inhiben la acción de esta enzima (130).

Con respecto a los parámetros cinéticos, se han informado para bovino, pollo y rata, valores de K_m de 11-28 μM para protoporfirina y de 33 a 166 μM para hierro (141).

CAPITULO II

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO EN EL HIGADO

A pesar de que se han descrito varios factores capaces de influenciar la actividad enzimática de casi todos los pasos en la biosíntesis del hemo, no hay duda de que el control regulatorio primario se ejerce a nivel de la primera enzima del camino, ALA-sintasa. Este sería el paso lógico para el control metabólico, ya que ALA es el primer precursor específico del camino y los sustratos iniciales, glicina y succinil CoA, se encuentran en abundancia. Además ALA-sintasa es el paso limitante de la velocidad en el camino (12, 38).

Se ha propuesto que existiría un "pool" celular de hemo libre (o hemo regulatorio) pero su identidad precisa o su localización intracelular aún no han sido definidas aunque hay evidencias indirectas que avalan su existencia. Este hemo regulatorio podría ser visualizado como un relativamente pequeño "pool" con una velocidad de recambio alta a donde se dirige el hemo recientemente sintetizado y de donde sale para combinarse con las apoproteínas del citocromo P450 (y otras hemoproteínas) o para su degradación (146).

II.1. Citocromo P450

La mayor parte del hemo sintetizado en los hepatocitos es utilizado para la síntesis de una serie de isoenzimas del citocromo P450.

Las enzimas del citocromo P450 catalizan la oxidación de una amplia variedad de drogas, pesticidas, carcinógenos, tóxicos y productos naturales así como compuestos endógenos: esteroides, ácidos grasos, vitaminas liposolubles y eicosanoides (147). Estas reacciones pueden ser agrupadas entre las categorías: hidroxilación, oxigenación, pérdida de heteroátomos, deshidrogenación, epoxidación y otras reacciones que dan como resultado inactivación enzimática. También en algunos casos catalizan reacciones de reducción. En la Figura 12 puede verse un esquema del mecanismo de acción del citocromo P450 extractado del trabajo de Porter y Coon (148).

Algunas de las transformaciones son esenciales para la vida, como la conversión de colesterol en corticoides y hormonas sexuales, y otras, particularmente con xenobióticos, llevan a la formación de compuestos más polares que son más fácilmente excretados o conjugados con agentes hidrosolubles como el ácido glucurónico o el glutatión (149). Esto es usualmente un proceso de detoxificación pero en algunos casos los compuestos exógenos son convertidos en productos con mayor toxicidad, mutagenicidad o carcinogenicidad.

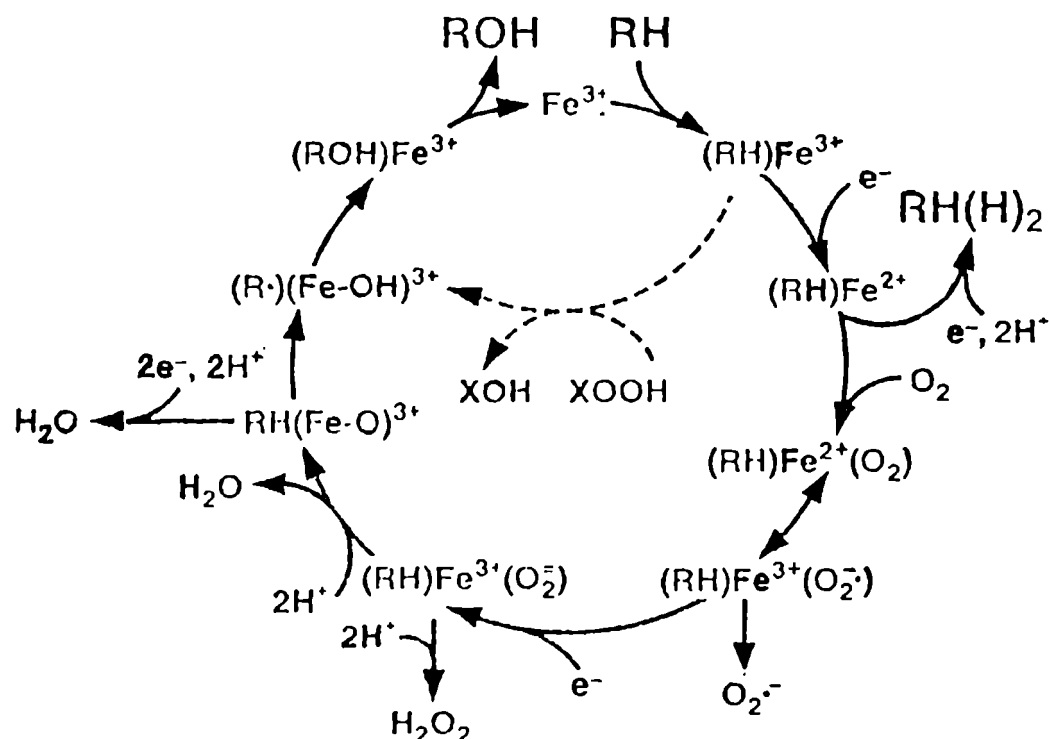


Figura 12: Esquema del mecanismo de acción del citocromo P450. Fe representa el átomo de hierro hémico del sitio activo, RH el sustrato, RH(H)₂ un producto reducido, ROH un producto mono-oxigenado y XO·OH un compuesto peróxido que podría servir como un dador alternativo de oxígeno.

La nomenclatura sistemática de las enzimas del citocromo P450, basada en la homología estructural, continúa evolucionando ya que cada año más citocromos P450 son caracterizados (150). Esta nomenclatura consiste en lo siguiente: aquellas proteínas del citocromo P450 con un 40% o más de identidad de secuencia son incluidas en la misma familia (la que se designa con números romanos) y aquellas con más de un 55% de identidad son incluidas en la misma subfamilia (designadas por letras mayúsculas). El gen individual se indica por un número romano luego de la designación de familia y subfamilia. En la actualidad hay 27 familias, 10 de las cuales existen en mamíferos. La principal ventaja de esta nomenclatura unificada es que citocromos P450 estructuralmente idénticos o altamente similares son fácilmente reconocibles independientemente de la fuente (especie, órgano, organela), del inductor o de la actividad catalíticamente examinada.

De las varias familias de citocromo P450, sólo tres parecen estar involucradas en el metabolismo de compuestos exógenos (151) (Tabla I).

Tabla I
Familias del citocromo P450 implicadas en el metabolismo de xenobióticos

Familia	Subfamilia	Características de sustrato	Agente inductor característico
P450 I	A	esencialmente plano	benzo[a]pireno
	B	amplia especificidad	fenobarbital
P450 II	E	pequeño peso molecular	etanol
	A	alto peso molecular	clotrimazol

No se conoce bien el rol fisiológico de estas familias pero se sabe que son capaces de metabolizar sustratos endógenos como esteroides y prostaglandinas aunque a muy baja velocidad. Frecuentemente un compuesto sirve como sustrato para más de una familia, pero las distintas familias muestran regioselectividad oxidándolo en diferentes sitios con importantes implicancias para su toxicidad. Esta selectividad parecería ser el resultado de diferencias en los sitios de unión tridimensionales de las enzimas para los sustratos y sus estados de transición. Un único citocromo P450 metaboliza distintas reacciones si ocurre la yuxtaposición correcta de la molécula en el sitio de unión (147). En roedores, existe bimorfismo sexual en las enzimas del citocromo P450 y varios animales de experimentación difieren unos de otros en la inducibilidad de sus citocromos P450 (por ejemplo las ratas responden bien a pregnenolona-16- α -carbonitrilo pero los conejos no) (147). Incluso dentro de la misma especie, las distintas cepas pueden variar en la inducibilidad de sus citocromos P450 (152).

La interacción de drogas porfirinogénicas con las isoenzimas del citocromo P450 resulta en inhibición de la biosíntesis del hemo y/o ruptura del hemo y por lo tanto en disminución del "pool" de hemo libre. Algunas drogas porfirinogénicas inducen la síntesis de la apoproteína del citocromo P450 y así el hemo es desviado hacia la síntesis del citocromo P450 (153). En la Figura 13 se esquematizan los distintos mecanismos por los cuales una droga porfirinogénica puede, a través de la interacción con el citocromo P450 disminuir los niveles del "pool" de hemo libre. Como veremos en la próxima sección, la disminución del hemo libre trae como consecuencia una elevación en la actividad de ALA-sintasa y la biosíntesis acelerada de porfirinas.

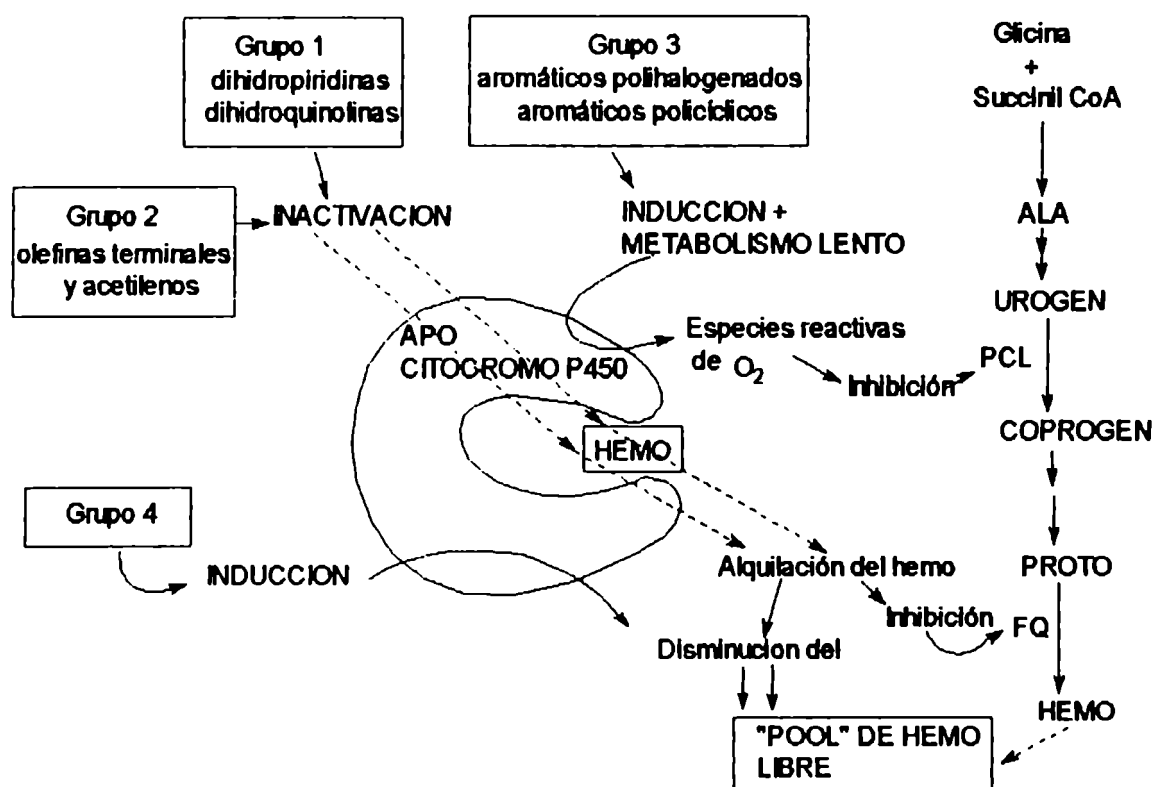


Figura 13: Disminución de los niveles del "pool" de hemo libre por la interacción de drogas porfirinogénicas con el citocromo P450.

PROTO: protoporfirina, UROGEN: uroporfirinógeno, COPROGEN: coproporfirinógeno, Grupo I: aquellos compuestos que forman N-alkilprotoporfirina e inhiben la ferroquelatasa (FQ), Grupo II: drogas que llevan a la destrucción continua del grupo hemo del citocromo P450, Grupo III: compuestos que aumentan la generación de especies de O₂ reactivas provocando la formación de un inhibidor de PCL y Grupo IV: compuestos que inducen la apoproteína de citocromo P450.

II.2. Regulación de la actividad de ALA-sintasa hepática

El modelo más aceptado para la regulación de la actividad de ALA-sintasa por hemo propone que la actividad basal e inducible de ALA-sintasa está regulada sólo por variaciones en las concentraciones de hemo del "pool" regulatorio (12). De acuerdo con este modelo, cuando la concentración de hemo libre decae, los niveles de ALA-sintasa tienden a incrementarse y ocurre el efecto opuesto cuando se incrementa la concentración de hemo libre. En ambos casos se observarían cambios en la actividad de la enzima de tal forma de llevar la concentración de hemo libre a los niveles normales. Además, cualquier exceso de hemo libre podría ser rápidamente transformado en pigmentos biliares por el sistema de hemo oxigenasa presente en los hepatocitos (154).

Con respecto a la inhibición de la actividad de ALA-sintasa por hemo, Scholnik y col. (155) encontraron inhibición con hemina con una K_i de $2 \times 10^{-5} M$ que es 200 veces mayor que la concentración necesaria para reprimir en cultivo la síntesis de la enzima (156). Este hecho hace dudar de la importancia fisiológica de esta inhibición por producto final.

Cuando se investigó el control transcripcional por hemo se vio que la síntesis de ALA-sintasa es extremadamente sensible a los niveles de hemo. Concentraciones de hemo en el rango de 20-50 nM inhiben la producción de ALA-sintasa inducida por AIA en hepatocitos aislados de embrión de pollo (157). Como la concentración de hemo intracelular en hepatocitos de embrión de pollo no tratados está en el orden de 50-100 nM, se infiere que el nivel de hemo *in vivo* es suficiente para inhibir la síntesis de ALA-sintasa. Experimentos llevados a cabo con embriones de pollo (158) y con ratas (159) proveyeron evidencia de que el hemo previene el incremento en los niveles del mRNA de ALA-sintasa inducido por drogas. En estos estudios se tradujeron *in vitro* los polisomas obtenidos de los hígados de los animales tratados y la enzima ALA-sintasa fue detectada por inmunoprecipitación. Evidencia más directa fue obtenida con análisis de hibridización usando una sonda de cDNA de hígado de embrión de pollo (12).

Los estudios acerca del efecto del hemo sobre la traducción del mRNA de ALA-sintasa han dado resultados disímiles. En 1976 se demostró que concentraciones de hemo tan altas como 10 μM no inhiben la síntesis de ALA-sintasa en experimentos de elongación utilizando polisomas de hígado de embrión de pollo (158). Otros investigadores estudiando la síntesis de ALA-sintasa en un sistema de reticulocitos de conejo dirigidos por polisomas totales de hígado de rata tratadas con AIA encontraron que el hemo, en concentraciones mayores que 20 μM , puede inhibir el paso de elongación de la cadena peptídica

del ALA-sintasa (160). Por otro lado, estudios con un sistema de germen de trigo libre de células muestran que la traducción del mRNA de ALA-sintasa no se ve afectada por concentraciones tan altas como 100 μ M (12).

Hay evidencias que indican que el hemo inhibe la transferencia del citosol a la mitocondria del precursor de ALA-sintasa de hígado de rata (161) y de embrión de pollo (12). El efecto parece ser específico ya que el hemo no previene la transferencia y el procesamiento de una proteína de matriz mitocondrial (piruvato carboxilasa) no relacionada con la enzima ALA-sintasa.

Resumiendo, el hemo ejercería un efecto regulatorio de retroalimentación sobre la enzima ALA-sintasa por inhibición de la transcripción, traducción y translocación de la enzima del citosol a la mitocondria (Figura 14) (153) y la inducción de ALA-sintasa por drogas porfirinogénicas ocurriría indirectamente como consecuencia de la disminución en los niveles de hemo.

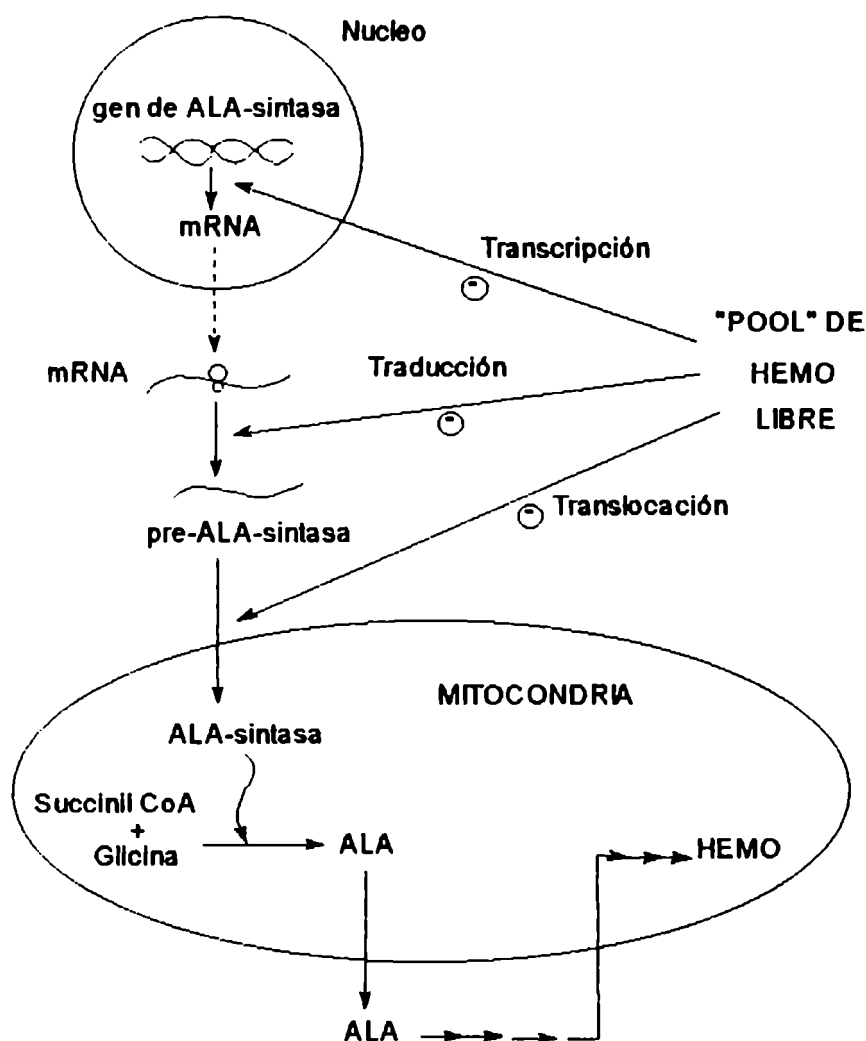


Figura 14: Represión de ALA-sintasa ejercida por hemo por inhibición de la transcripción, traducción y translocación de la enzima del citosol a la mitocondria

Por otro lado, Hamilton y col. (162) proponen un modelo para la regulación de la expresión del mRNA de ALA-sintasa en el cual las drogas porfirinogénicas directamente inducen la expresión del mRNA para ALA-sintasa y el hemo actuaría como un modificador de esta inducción. Para ello estudiaron el efecto de drogas inductoras, de inhibidores de la biosíntesis del hemo, hemo y cicloheximida sobre la expresión del mRNA en estado estacionario para ALA-sintasa y para el principal citocromo P450 inducible por fenobarbital en hepatocitos de pollo "in vivo" y en cultivo primario. En base a los resultados obtenidos ellos postulan que el hemo regula a la enzima ALA-sintasa primariamente en el sitio de translocación de la enzima recién sintetizada a la mitocondria y que las drogas inductoras actúan a nivel de la transcripción para incrementar los niveles del mRNA de ALA-sintasa. Además postulan la presencia de un represor proteico lábil que modularía la expresión del mRNA de ALA-sintasa y que sería sensible al hemo.

Ryan y Ades (163), Drew y Ades (164) y más recientemente Dogra y col. (165) observaron co-inducción de ALA-sintasa y citocromo P450 por drogas porfirinogénicas. Al igual que Hamilton y col. (162) ellos postulan que esta co-inducción no sería un resultado directo de cambios en las concentraciones intracelulares de hemo sino mas bien se debería a una activación transcripcional de los genes que codifican para ALA-sintasa y citocromo P450.

CAPITULO III

PORFIRIAS

Las porfirias son un grupo heterogéneo de desórdenes, principalmente heredados, en los cuales anomalías específicas de las enzimas del camino metabólico del hemo causan anomalías clínicas generalizadas.

Se las puede clasificar en porfirias agudas y no agudas (Tabla II) (166).

TABLA II: Clasificación de las porfirias

AGUDAS	NO AGUDAS
♦ Porfiria aguda intermitente (H) ♦ Porfiria variegata (H) ♦ Coproporfiria hereditaria (H) ♦ Plumboporfiria (H)	♦ Porfiria congénita (enfermedad de Gunter) (E) ♦ Porfiria cutánea tarda (H) ♦ Protoporfiria eritropoyética (E)

H: hepática, E: eritropoyética

Otra forma de clasificación tiene en cuenta los tejidos en los que se expresan fundamentalmente las alteraciones metabólicas: el hígado y médula ósea. Así, se las clasifica en hepáticas y eritropoyéticas (Tabla II) (167)

Todas se heredan de forma autosómica dominante salvo la porfiria congénita que es recesiva y la porfiria hepatoeritropoyética que es una forma homocigota de la porfiria cutánea tarda. Cada uno de los diferentes tipos de porfiria está asociado a una deficiencia en una enzima específica del camino metabólico del hemo aunque en algunas circunstancias puede haber mas de una enzima afectada. Como consecuencia de los defectos enzimáticos, hay un incremento en la actividad de la primera enzima del camino biosintético, ALA-sintasa, con la consecuente sobreproducción y excreción incrementada de porfirinas y precursores (Figura 15).

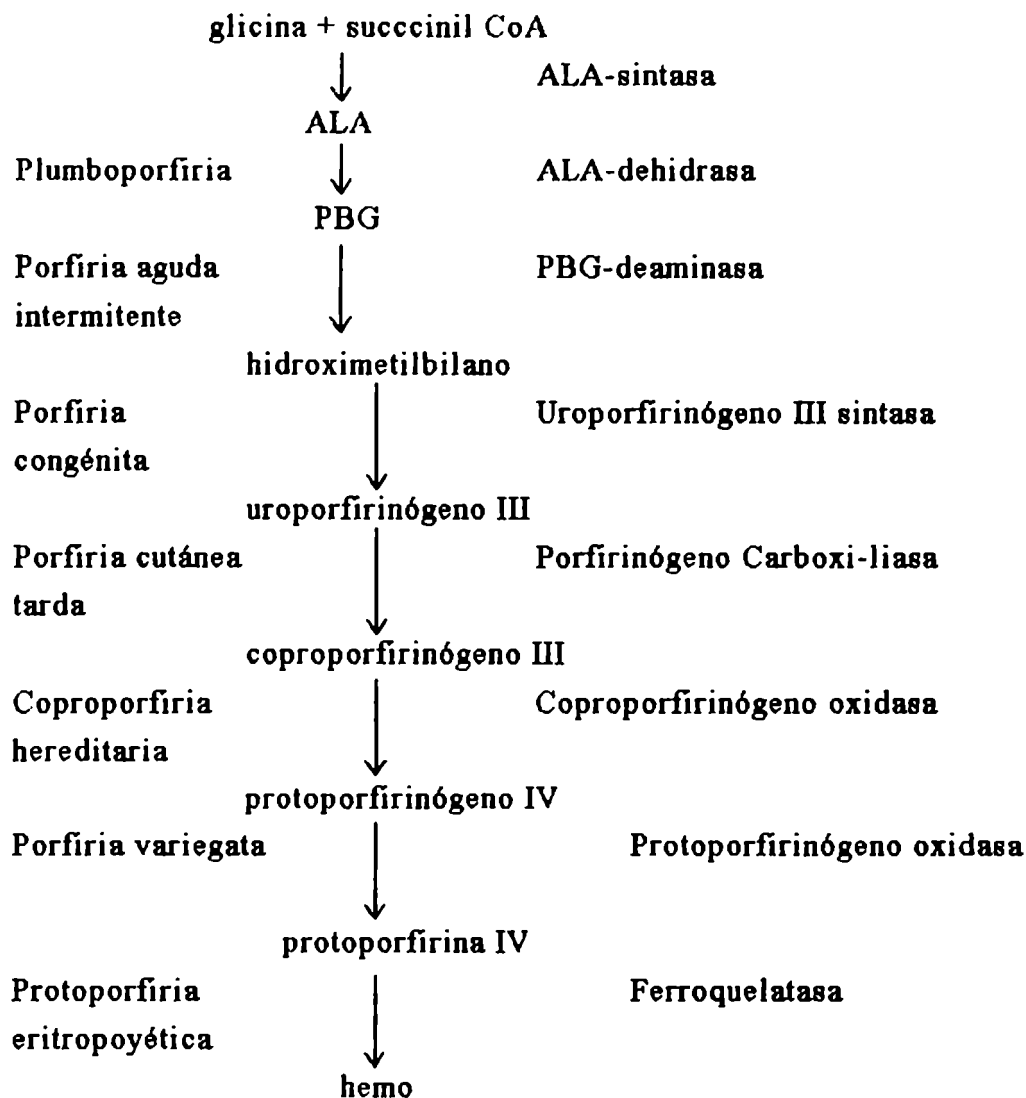


Figura 15 : Biosíntesis del hemo y porfirias

III-1. Porfirias Agudas

Los pacientes con porfirias agudas pueden experimentar ataques de disfunción neurovisceral con dolor abdominal y muchas veces acompañado de neuropatía periférica y disturbios psiquiátricos. Los pacientes con coproporfiria hereditaria y porfiria variegata también pueden presentar fotosensibilidad. Durante un ataque, todos los pacientes excretan un exceso masivo de ALA y PBG en su orina. Una gran variedad de factores pueden precipitar los ataques clínicos en estos pacientes. El principal factor precipitante es la ingesta de drogas incluyendo barbitúricos, sulfonamidas, anticonceptivos orales, anticonvulsivos y

antidepresivos. El consumo de alcohol, el ayuno, factores hormonales endógenos y exógenos y en la mujer, el embarazo también pueden precipitar ataques (166).

III-2. Porfirias no agudas

Son fundamentalmente enfermedades dermatológicas que se presentan clínicamente como fotosensibilidad cutánea. Las responsables de las características lesiones cutáneas que presentan estas porfirias son las porfirinas que se depositan en la capa superior de la epidermis.

La porfiria cutánea tarda (PCT) existe en dos formas: heredada y adquirida. En ambas la actividad de PCL hepática está disminuida pero la actividad de PCL en células de sangre periférica está disminuida sólo en la forma hereditaria. En la enfermedad adquirida, el principal precipitante es el alcohol aunque los anticonceptivos orales también son importantes. Otros casos han sido asociados a hidrocarburos polihalogenados (168), al fungicida hexaclorobenceno (168) y como secundarios a tumores hepáticos benignos o malignos (169).

III-3. Metabolismo de porfirinas en otras enfermedades

Varias enfermedades como anemias y desórdenes hepatobiliares pueden estar asociadas con un moderado incremento en la excreción urinaria de porfirinas, en especial de coproporfirina (170). Esto se conoce como porfirinurias secundarias.

La tirosinemia hereditaria es un desorden metabólico en el que se acumula succinilacetona, que es un inhibidor del ALA-dehidrasa. Esto lleva a la excreción aumentada de ALA en la orina y a la manifestación de síntomas neurológicos similares a los observados en las porfirias agudas (171, 172).

Ocasionalmente también puede observarse en pacientes con enfermedad crónica renal un cuadro similar al de PCT, principalmente en aquellos que están sometidos a hemodiálisis (173).

Asimismo, se han observado altos niveles de porfirinas en pacientes con carcinomas hepatocelulares y muchos autores advirtieron la aparición simultánea de PCT y tumores de órganos internos (174). Esta asociación entre porfiria y cáncer será tratada con mayor detalle en el capítulo IV.

III-4. Porfirias experimentales

Desórdenes que simulan los disturbios bioquímicos de distintos tipos de porfirias humanas pueden ser inducidos químicamente en animales de laboratorio.

Estos desórdenes se conocen como porfirias experimentales y en los últimos años varios compuestos no relacionados químicamente han sido utilizados para producir porfiria en animales de laboratorio o en cultivos primarios de hígado de embrión de pollo. Entre las especies animales utilizadas para testear la capacidad de drogas para inducir la actividad de ALA-sintasa y para incrementar la producción hepática de porfirinas se encuentran la rata, el ratón, el conejo y el embrión de pollo. Este último es inusualmente sensible a los efectos porfirinogénicos de las drogas y se ha propuesto que refleja mejor la susceptibilidad humana a la exacerbación de la porfiria por drogas que los mamíferos (175).

Entre los modelos de porfiria más estudiados se encuentran los provocados por la administración a animales de los compuestos 3,5-dicarbetoxy-1,4-dihidrocolidina (DDC), alilisopropilacetamida (AIA) y hexaclorobenceno (HCB).

III-4.1. Porfiria experimental por DDC

La dihidropiridina, DDC (Figura 16), produce en animales de experimentación una porfiria hepática que semeja la porfiria variegata humana ya que la principal porfirina que se acumula en el hígado es protoporfirina (176).

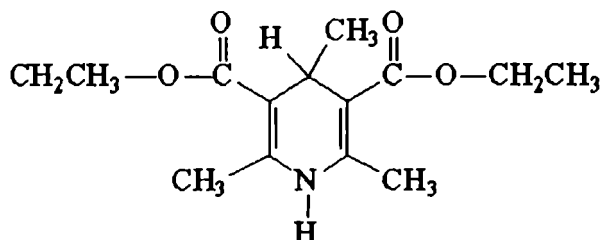


Figura 16: Estructura química del DDC

El DDC reduce la actividad hepática de la enzima ferroquelatasa en roedores (177), en el embrión de pollo de 17 días (178) y en cultivo de

hepatocitos de ratón (179) pero este efecto no es producido *per se* ya que *in vitro* no es capaz de inhibir la actividad de la enzima. El verdadero inhibidor es el pigmento verde N-metilprotoporfirina (N-MePP) que se acumula en el hígado de los roedores tratados con DDC. La fuente del sustituyente N-metil de la N-MePP es el grupo metilo en la posición 4 del DDC (180). Cuando el DDC y análogos relacionados son incubados con microsomas hepáticos de rata o embrión de pollo se observa que hay inactivación del citocromo P450. Por lo tanto se propuso que la parte protoporfírica de la N-MePP proviene del grupo prostético hémico del citocromo P450 (181). El mecanismo propuesto es el siguiente: DDC interactúa con el centro activo del citocromo P450 y el átomo de nitrógeno del DDC sufre oxidación formandose un catión radical el cual es inestable y por lo tanto se elimina un radical metilo. Este radical alquila uno de los cuatro átomos de nitrógeno pirrólicos del grupo hemo del citocromo P450. Posteriormente se elimina el átomo de hierro del hemo alquilado formandose así la N-MePP. N-MePP luego migra dentro de la célula alcanzando dentro de la membrana interna de la mitocondria a la enzima ferroquelatasa a la cual se une con alta afinidad (130). Los cuatro isómeros de N-MePP que se forman (ya que hay cuatro nitrógenos posibles de ser alquilados) presentan igual potencia inhibidora de ferroquelatasa (182). La inhibición de ferroquelatasa es luego seguida por una estimulación secundaria de ALA-sintasa y como resultado de ambos efectos se acumula protoporfirina en exceso (146). Esta estimulación del ALA-sintasa sería una consecuencia de la disminución del "pool" de hemo libre por la disminución de la actividad de ferroquelatasa y por la destrucción y síntesis *de novo* del citocromo P450. Mackie y Marks (183) indican que la inhibición de ferroquelatasa es un mecanismo de disminución del hemo más importante que la alquilación del citocromo P450 cuando actúan ambos mecanismos de disminución del "pool" de hemo libre.

De Matteis (176) encontró que cuando se les daba a ratas una relativamente pequeña dosis de DDC, los animales desarrollaban una porfiria hepática semejante a la porfiria variegata en su fase latente ya que se hacían sensibles a barbitúricos y a otras drogas que pueden exacerbar el desorden metabólico mostrando el cuadro bioquímico típico de un ataque agudo en humanos. En contraste, los barbitúricos *per se* no eran capaces de incrementar la excreción de porfirinas y precursores en las ratas normales así como no pueden alterar el metabolismo de porfirinas en individuos normales.

Anderson (184) adaptó el principio al embrión de pollo *in ovo*, el efecto porfirinogénico de diversas drogas puede ser así medido por el dosaje en el

hígado de la actividad de ALA-sintasa y de las porfirinas acumuladas luego de una débil dosis de DDC.

Este modelo ha sido utilizado por distintos autores (185, 186) para testear la porfirinogenicidad de gran variedad de drogas utilizadas terapéuticamente y será utilizado en el presente trabajo para testear la porfirinogenicidad de diversos antineoplásicos.

III-4.2. Porfiria experimental por AIA

En 1952 se observó que la droga hipnótica Sedormid, alilisopropil-acetilcarbamida, causaba una porfiria experimental en conejos y en ratas siendo el hígado el principal sitio de acción y en donde se acumulaba gran cantidad de porfirinas. Posteriormente se encontró que el análogo de Sedormid, AIA (Figura 17) era igualmente efectivo y mucho más conveniente ya que los animales permanecían completamente conscientes (187, 188).

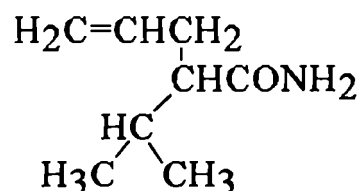


Figura 17: Estructura química del AIA

La porfiria inducida por AIA en ratas semeja la porfiria aguda intermitente, con gran excreción de los precursores ALA, PBG y porfirinas de la serie isomérica III y sin fotosensibilidad o parálisis.

AIA es el prototipo de un grupo de compuestos que disminuyen los niveles de hemo libre por destrucción de la mitad hémica del citocromo P450. En el proceso de inactivación del citocromo P450 por AIA, se produce la alquilación de uno o varios nitrógenos del grupo prostético hemo. Este hemo alquilado pierde el átomo de hierro y se forma un aducto AIA-protoporfirina en una relación 1:1 de color verde (189). El aducto AIA-protoporfirina no comparte la capacidad de las N-alquilporfirinas formadas a partir de los 4-alquil análogos del DDC de inhibir la actividad de ferroquelatasa. La pérdida del grupo prostético hémico del citocromo P450 microsomal hepático y la formación del pigmento verde puede ser reproducido *in vitro* por la incubación de la fracción microsomal con AIA u otro

compuesto alílico en la presencia de NADPH (190, 191). Se piensa que el aducto AIA-protoporfirina se disocia del citocromo P450 y que la apoproteína se combina con hemo fresco para reconstituir la holoproteína (192). La continua interacción con AIA lleva a una marcada disminución del hemo libre hasta el punto en que la enzima ALA-sintasa es dereprimida. Cuando se investigó la relación entre estructura química y capacidad para destruir el citocromo P450, se vio que era importante el grupo alílico terminal (192).

Ortiz de Montellano y col. (193) demostraron que AIA inactiva la principal isoenzima inducible por fenobarbital del citocromo P450 de hígado de rata (P450 2B1) aunque también otras isoenzimas (P450 2A1, 2C11, 3A1/A2 y 2C6) son susceptibles de ser inactivadas (194). Si bien varias de estas isoenzimas inactivadas por destrucción del grupo hémico sufren pérdida de la apoproteína luego de su inactivación otras no. Por ejemplo, luego de la destrucción del grupo prostético hémico del citocromo P450 2C11 por AIA la apoproteína sufre proteólisis mientras que la inactivación por AIA de los citocromos P450 2C6, 2B1 y 3A1/A2 no produce proteólisis, al menos dentro de las cinco horas del tratamiento con la droga (195).

Estudios con hígado de embrión de pollo claramente establecieron que luego de la administración de AIA a los embriones, hay síntesis *de novo* de la apoproteína del citocromo P450 debido a un aumento en los niveles de mRNA de la hemoproteína (196). Así AIA se comporta como un inductor del citocromo P450 tipo fenobarbital en el hígado del embrión de pollo (197) y en el hígado de rata (198).

Drew y Ades (164) determinaron por análisis de hibridización cDNA-RNA que luego de la administración de AIA + DDC a embriones de pollo de 18 días *in ovo*, las concentraciones de RNA del citocromo P450 aumentaron en hígado, riñón e intestino. Este incremento en la concentración del RNA del citocromo P450 ocurrió sólo en los órganos donde también se vieron aumentos en la actividad de ALA-sintasa y en el contenido del mRNA de ALA-sintasa pero no en aquellos donde la actividad o los niveles del RNA de ALA-sintasa no sufrieron modificación (corazón, cerebro y pulmón). Los incrementos en las concentraciones del RNA del citocromo P450 no se vieron afectados por administración conjunta de ALA, FeCl₃ y los inductores aunque se observó una disminución parcial de los niveles del mRNA del ALA-sintasa. Estos autores sugieren que la co-inducción de ALA-sintasa y del citocromo P450 no sería un resultado directo de cambios en las concentraciones intracelulares del hemo sino más bien se debería a una activación transcripcional de los genes que codifican para ALA-sintasa y para las especies inducidas del citocromo P450. Avalarían

esta hipótesis los resultados obtenidos con propilisopropilacetamida (162) y con fenobarbital (163) donde se vio que las concentraciones del mRNA para ALA-sintasa y para el citocromo P450 aumentaban rápidamente y con velocidad similar.

III-4.3. Porfiria experimental por hexaclorobenceno

Entre 1957 y 1960 ocurrió en Turquía un dramático desencadenamiento de PCT esporádica. Esto se debió a la ingesta de semillas de trigo tratado con el fungicida HCB (168) (Figura 18). De los 4000 casos de intoxicación con HCB que se registraron, hubo una especial mortandad de lactantes debido a las altas concentraciones del fungicida en la leche materna ya que el HCB se retiene en los depósitos de grasa corporales. Aún 30 años después de la catástrofe, muchos de los pacientes continuaron excretando elevados niveles de uroporfirina en la orina (199). Aunque actualmente el uso del HCB como fungicida está prohibido en la mayoría de los países, en algunos lugares se han detectado altos niveles atmosféricos de este compuesto ya que es un subproducto de la producción industrial de compuestos organoclorinados (200).

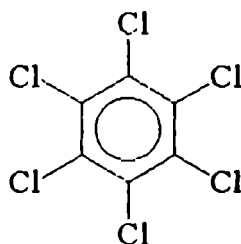


Figura 18: Estructura química del hexaclorobenceno

En animales, el HCB promueve una porfiria experimental que semeja la PCT humana y por lo tanto se lo utiliza como modelo para su estudio (201). Luego de la administración de HCB a ratas, se produce una importante acumulación en el hígado y una elevada excreción urinaria de porfirinas altamente carboxiladas (202, 203). Estos efectos son una consecuencia del marcado decremento que la droga produce en la actividad de PCL hepática (204), lo que va acompañado por incrementos en las actividades de ALA-sintasa, ALA-dehidrasa, PBG-deaminasa y ferroquelatasa (205).

El HCB no es la única droga capaz de causar uroporfiria. Otros hidrocarburos aromáticos polihalogenados (HAPH) como los bifenilos polibrominados (PBP) y la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) tienen un efecto similar al HCB, no sólo en animales de experimentación sino también en seres humanos como la intoxicación por PBP que afectó a animales domésticos y al hombre en Michigan, USA y los casos de los trabajadores industriales expuestos a TCDD en fábricas de USA y de Checoslovaquia. En todos estos casos, las manifestaciones bioquímicas y clínicas fueron muy similares a las de PCT (146).

El establecimiento de porfiria en animales depende de la cepa y del sexo. Así las ratas hembras son más susceptibles a los efectos porfirinogénicos del HCB que los machos (202, 206). Con respecto a la cepa se vio que las ratas Agus son más susceptibles que las Porton Wistar (207) y las Wistar lo son más que las CHBBTHOM (208).

El desarrollo de porfiria por HCB puede ser estimulado (209, 210) o inhibido (211) incrementando o disminuyendo respectivamente el contenido hepático de hierro. La presencia de hierro parece por lo tanto ser de gran importancia pero no se conoce su rol exacto.

Fenobarbital (201) estimula la porfiria inducida por hidrocarburos aromáticos polihalogenados y propoxifeno la inhibe (212). Fenobarbital es un conocido inductor de las oxigenasas de función mixta mientras que propoxifeno es un inhibidor de estas enzimas. Las oxigenasas de función mixta dependientes del citocromo P450 juegan un papel importante en la metabolización del HCB y por lo tanto es probable que dicha metabolización sea necesaria para que el fungicida ejerza su efecto porfirinogénico (201).

El HCB es metabolizado a compuestos clorofenólicos, compuestos que contienen azufre y varios clorobencenos (213). Estos metabolitos no reproducen los efectos porfirinogénicos del HCB *in vivo* (214, 215) aunque se encontró que varios de ellos pueden inhibir la actividad de PCL *in vitro* (216).

Alleman y col. (217) encontraron signos de peroxidación lipídica en ratas porfíricas por HCB. Ellos vieron que la actividad enzimática de glucosa-6-fosfatasa microsomal estaba disminuida y que había un aumento en el malondialdehído hepático y en la formación de proteínas de alto peso molecular. Esto sugeriría que en la porfiria por HCB se formarían radicales libres aunque Visser y col. (218) no pudieron demostrar una clara secuencia temporal entre la peroxidación lipídica y la porfiria inducida por HCB.

Se han sugerido dos mecanismos para explicar la acumulación de

uroporfirina y heptacarboxiporfirina en la porfiria por HAPH:

1) por oxidación de los porfirinógenos a porfirinas. Una isoenzima del citocromo P450 inducible por HAPH, interactuaría con el HAPH en la presencia de NADPH y hierro, incrementando la formación de alguna/s especie/s oxidante/s (probablemente especies de oxígeno reactivo) que oxidaría el uroporfirinógeno y el firiaporfirinógeno a sus respectivas porfirinas (219, 220). Esta oxidación estaría asociada con la inhibición de PCL ya que durante la oxidación de los porfirinógenos se formaría un inhibidor lábil (221).

2) por la formación de un inhibidor de PCL. Se observó que extractos de hígados de ratas tratadas con HCB (222, 223) y extractos calentados de hígados de ratones tratados con TCDD (224) son capaces de inhibir la actividad de PCL de citosol hepático control. Esta inhibición no es debida a la acumulación de uroporfirina ya que ésta puede ser removida por cartuchos de SEP-PAK C₁₈ sin afectar la actividad inhibitoria (225). Este inhibidor se uniría al mismo sitio que el sustrato, no sería un producto metabólico del HCB y la interacción enzima-inhibidor no parecería estar mediada por radicales libres (S.C. Billi de Catabbi, R. Wainstok de Calmanovici y L.C. San Martín de Viale, comunicación personal).

CAPITULO IV

PORFIRIA Y CANCER

IV-1. Relación entre tumores y disturbios en el metabolismo del hemo

En 1957 Tio y col. (226) describieron el caso de una mujer de 80 años que desarrolló fotosensibilidad asociada a una marcada excreción de porfirinas. Esta mujer era portadora de un tumor hepático benigno que cuando fue removido cesaron la excreción de porfirinas y los síntomas clínicos. Cuando se analizó el tumor se observó que poseía gran cantidad de porfirinas (sobre todo uroporfirina III) en los conductos biliares y en el citoplasma de las células tumorales. Cuando la mujer murió dos años mas tarde, la autopsia reveló que el hígado estaba libre de cirrosis y de porfirinas. Esto convalidó la idea de que las porfirinas habían sido sintetizadas por el tumor.

Posteriormente, en 1970, Thompson y col. (227) describieron por primera vez un caso de porfiria adquirida debido a un hepatoma primario maligno sin cirrosis. El tejido tumoral presentaba fluorescencia bajo la luz ultravioleta y un exceso de porfirinas mientras que el hígado circundante no mostraba un contenido anormal de porfirinas. Esto sugeriría que el tejido tumoral fue el productor de las porfirinas.

Udagawa y col. (228) estudiaron 15 pacientes con carcinomas hepatocelulares y 14 con cirrosis hepática. Ellos encontraron que los pacientes con carcinoma hepatocelulares excretaban más uroporfirina y coproporfirina en orina que aquellos con cirrosis concluyendo que el metabolismo de porfirinas en estos pacientes semejaría una porfiria hepática crónica.

En todos los casos presentados, la presencia del tumor habría sido la causa del desarrollo de una porfiria o pseudoporfiria. Por otro lado hay reportes en donde el desarrollo de un carcinoma sería posterior a la porfiria. Por ejemplo, en 1979, Enriquez de Salamanca y col. (229) describieron el caso de un paciente portador de una porfiria cutánea latente sobre la que se desarrolló un hepatocarcinoma trabecular. Presentaba incremento de las porfirinas octo y heptacarboxílicas en orina y en tejido hepático normal y una cantidad de porfirinas prácticamente normal en tejido neoplásico.

Solis y col. (230) examinaron la incidencia de hepatomas en 138 pacientes con PCT y en 358 con cirrosis hepática y sin porfiria. En hombres, se observó un incremento significativo en la incidencia de hepatomas en el grupo porfirico cuando se lo comparó con el grupo no porfirico.

Además de la asociación PCT-cáncer, se ha descripto una alta ocurrencia de cáncer primario de hígado y porfiria aguda intermitente (231) y recientemente

se describió el caso de dos hermanas con porfiria aguda intermitente que desarrollaron un carcinoma primario de hígado en ausencia de cirrosis (232). También se encontró un metabolismo de porfirinas aberrante relacionado con otras malignidades como leucemia linfoblástica aguda, linfoma de Hodgkin y enfermedad de Hodgkin (233).

Aunque hay una gran cantidad de evidencia que indica una posible asociación entre porfiria y cáncer todavía no está claro como puede la porfiria predisponer para la adquisición de un hepatoma maligno.

Los estudios llevados a cabo con animales arrojaron resultados disímiles.

Zawirska y Bednarz (234) informaron que en ratas alimentadas con aflatoxina B₁, el proceso de carcinogenesis fue acompañado por un creciente desorden en el metabolismo de porfirinas y que el contenido de porfirinas fue mayor en los hepatomas primarios que en el tejido de origen. Por otro lado, nódulos hepáticos neoplásicos inducidos en ratón por la administración de griseofulvina (un potente agente porfirinogénico) se diferenciaron del tejido peritumoral no neoplásico en su ausencia de porfirinas y en la menor inducción de la enzima ALA-sintasa (235). Similarmente se observó que hepatomas y otros tipos de tumores inducidos en ratas no acumularon porfirinas ni mostraron inducción de la actividad de ALA-sintasa como resultado de la acción de drogas porfirinogénicas como AIA (236) o DDC (237). Sin embargo, en ratas expuestas por aproximadamente dos años al HCB, los tumores hepáticos inducidos por este fungicida no mostraron diferencias con el tejido circundante en cuanto a los niveles de porfirinas o a las actividades enzimáticas (238).

Resumiendo, vemos que hay casos en los que el tumor acumula más porfirinas que el tejido circundante, otros en los cuales no se ve acumulación de porfirinas por el tumor y otros en los cuales el contenido de porfirinas es similar en el tumor y en el tejido circundante.

IV-2. Antineoplásicos y camino metabólico del hemo

Es importante que los médicos sean informados sobre los riesgos de las drogas terapéuticas en porfiria debido a las graves consecuencias que pueden traer en pacientes con porfiria latente o en aquellos con una porfiria declarada. Por lo tanto es necesario conocer qué drogas pueden usarse en porfiria y cuáles podrían exacerbar la enfermedad.

El uso de antineoplásicos es común en la terapia del cáncer y entre ellos los agentes alquilantes han jugado un importante rol en el desarrollo de la quimioterapia de la enfermedad. Sin embargo no se ha estudiado mucho su efecto sobre el camino metabólico del hemo. En 1981, Arbus (239) planteó la cuestión de qué antineoplásicos podrían utilizarse en el caso de un paciente porfirico y aún hoy muy pocos reportes sobre el tema pueden encontrarse en la literatura.

IV-2.1. Agentes alquilantes: ciclofosfamida, clorambucilo, melfalan y busulfano

Los agentes alquilantes son aquellas drogas antitumor cuya actividad citotóxica está mediada por la unión covalente de grupos alquilo a moléculas celulares. Los agentes alquilantes más usados clínicamente han sido las mostazas nitrogenadas. La estructura general de estos compuestos puede verse en la Figura 19 donde tomando $R = -CH_3$ se obtiene la estructura de la mecloretamina.

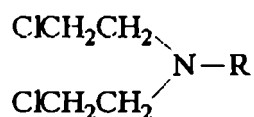


Figura 19: Estructura general de una mostaza nitrogenada

Después de la introducción de la mecloretamina, se sintetizó una gran variedad de análogos en los cuales el grupo metilo fue reemplazado por una variedad de grupos químicos. De esos análogos, los más utilizados clínicamente son melfalan, clorambucilo y ciclofosfamida (Figura 20).

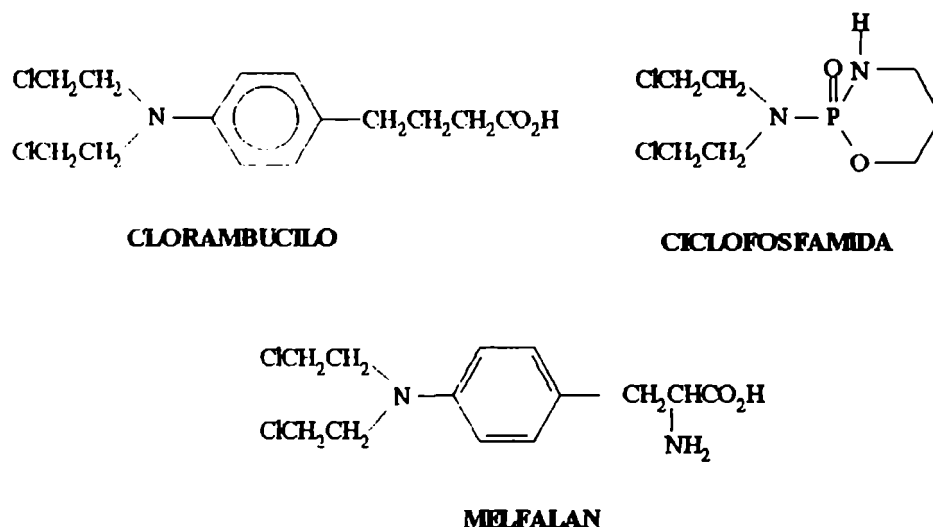


Figura 20: Derivados de la mostaza nitrogenada usados clínicamente

Ciclofosfamida *per se* no posee actividad alquilante y debe ser metabolizada por el citocromo P450 para producir compuestos alquilantes (Figura 21). Los metabolitos de ciclofosfamida, acroleína y 4-hidroxiciclofosfamida desnaturalizan el citocromo P450 microsomal mientras que el otro metabolito, mostaza fosforamida, ciclofosfamida *per se* o su análogo isofosfamida no tienen efecto (240).

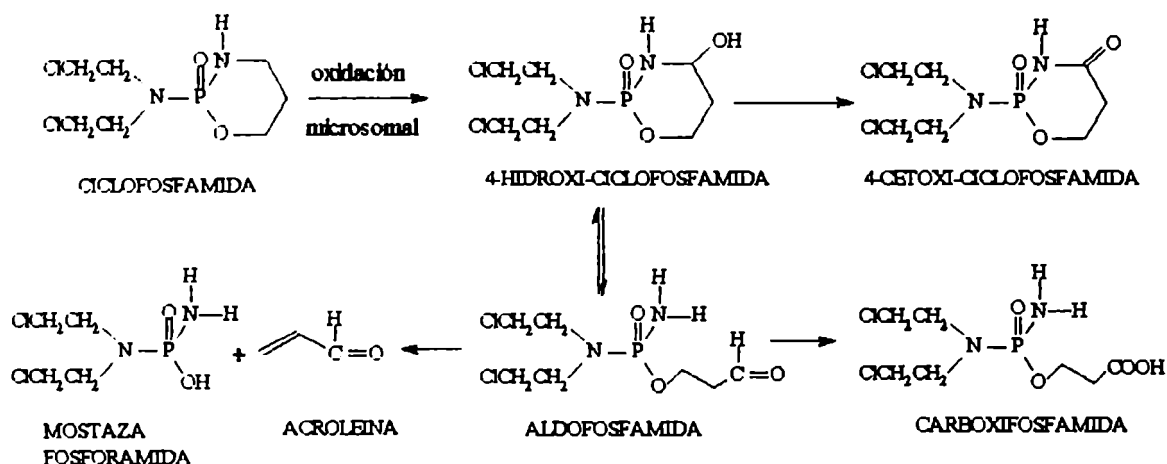


Figura 21: Transformación metabólica de la ciclofosfamida

Ciclofosfamida es el agente alquilante más utilizado y tiene actividad contra una gran variedad de tumores (241). Melfalan es utilizado para el tratamiento de cáncer de ovario, mieloma múltiple y carcinoma de mama y clorambucilo para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, linfomas y carcinoma de ovario (241).

Busulfano pertenece al grupo de los alquil alcano sulfonatos (Figura 22) y es ampliamente utilizado para el tratamiento de la leucemia granulocítica crónica (241).

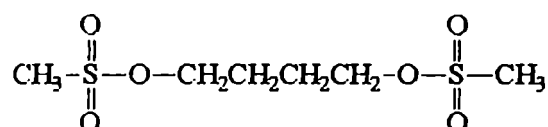


Figura 22: Estructura química del busulfano

Existen en la literatura algunos reportes acerca del efecto de estos agentes alquilantes sobre el camino metabólico del hemo. Así, en humanos, Kyle y Dameshek (242) reportaron la capacidad potencial de busulfano para acelerar la aparición de PCT y Manzione y col. (243) describieron más recientemente el caso de una mujer con carcinoma ovárico que desarrolló PCT luego del tratamiento con cisplatina y ciclofosfamida, adjudicándole el efecto porfirinogénico a esta última droga.

En animales, Palma-Carlos y col. (244) informaron resultados variables al estudiar el efecto de los agentes alquilantes ciclofosfamida, busulfano y clorambucilo en ratas y Wainstok de Calmanovici y San Martín de Viale (245) informaron que ciclofosfamida tiene una capacidad porfirinogénica alta en embrión de pollo. Por otra parte, busulfano a pesar de haber alterado el camino biosintético del hemo no alteró la regulación de la actividad de ALA-sintasa.

Estudios llevados a cabo en ratas machos con ciclofosfamida (246) mostraron que este antineoplásico es capaz de disminuir la actividad hepática de ALA-sintasa e inducir la actividad de hemo oxigenasa en hígado.

IV-2.2 Agentes alquilantes no clásicos: procarbazina, dacarbazina y hexametilmelamina

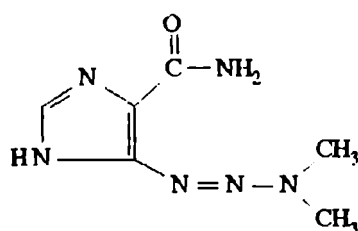
Procarbazina, dacarbazina y hexametilmelamina (HMM) son las tres drogas de mayor importancia clínica del grupo de los agentes alquilantes no clásicos. Su estructura química puede verse en la Figura 23.

Procarbazina es de particular importancia en la quimioterapia de la enfermedad de Hodgkin debido a que no presenta reacción cruzada con otros agentes quimioterapéuticos (247). También es útil en el tratamiento de tumores cerebrales (241).

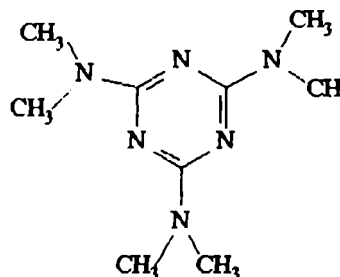
El uso clínico de dacarbazina está restringido al tratamiento del melanoma maligno (248) y a la enfermedad de Hodgkin (249).

HMM es un derivado de triazina que es clínicamente activo contra cáncer de pulmón, cáncer de ovario y linfoma maligno (250).

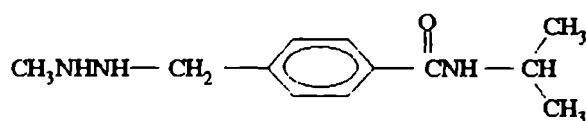
No existen en literatura reportes sobre el efecto de estos antineoplásicos en el camino metabólico del hemo.



DACARBAZINA



HEXAMETILMELAMINA



PROCARBAZINA

Figura 23: Estructura química de los agentes alquilantes no clásicos procarbazina, dacarbazina y hexametilmelamina.

IV-2.3 Fluorouracilo y azatioprina

Fluorouracilo es un análogo fluorinado de la base pirimidínica uracilo (Figura 24). Fue sintetizado basándose en las observaciones de que los hepatomas de rata utilizaban más ávidamente el uracilo marcado radiactivamente que los tejidos no malignos. Este compuesto es útil en el tratamiento de tumores sólidos, incluyendo cáncer de mama, cáncer de ovario y adenocarcinomas gastrointestinales (241).

Azatioprina es un análogo de purina (Figura 24) que fue sintetizado originalmente como una forma protegida de la 6-mercaptopurina. Es utilizado primariamente como un agente inmunosupresor aunque en algunos casos también ha sido utilizado como agente antineoplásico (241).

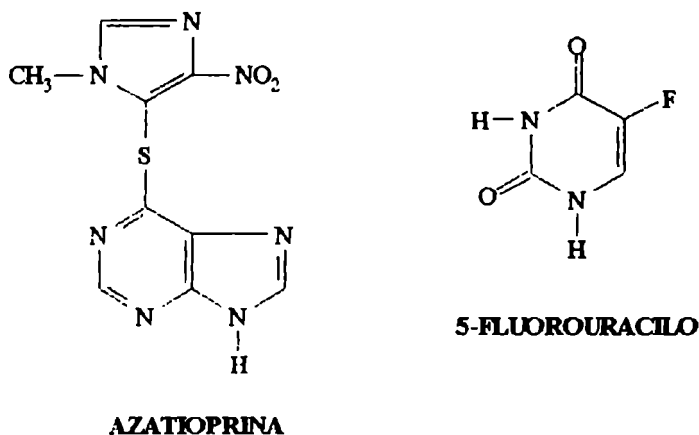


Figura 24: Estructura química de fluorouracilo y azatioprina

Con respecto a la acción de estos antineoplásicos sobre el camino metabólico del hemo, sólo hay un reporte concerniente a fluorouracilo. En él, se encontró que este antineoplásico no fue porfirinogénico en el embrión de pollo en dosis de hasta 40 mg/embrión (245). No hay datos en la literatura sobre la porfirinogenicidad de azatioprina.

IV- 3. Porfirinas en la detección y terapia del cáncer

La detección y el tratamiento de neoplasias usando luz y un agente fotosensibilizante han generado interés en varias disciplinas. Las propiedades fotodinámicas de pigmentos tetrapirrólicos como las porfirinas se conocen desde comienzos del siglo XX, cuando Meyer-Betz se autoadministró hematoporfirina

(HP) (Figura 25) para determinar sus efectos biológicos (251). Observaciones de que tejidos neoplásicos, embrionicos y traumatizados tienen afinidad por porfirinas y metaloporfirinas fueron realizadas hace más de 40 años (252) sugiriendo el potencial uso de pigmentos tetrapirrólicos y luz en la detección y la terapia del cáncer. Esta posibilidad de destrucción tumoral fue designada en 1972 por Diamond y col. (253) como terapia fotodinámica (PDT). En los últimos años ha habido un gran incremento en las investigaciones involucradas en el área de PDT. En este sentido los fotosensibilizantes más estudiados han sido hematoporfirina (HP), HPD (un derivado sintético de hematoporfirina) y Photofrin II (una fracción enriquecida derivada de HPD) (254, 255).

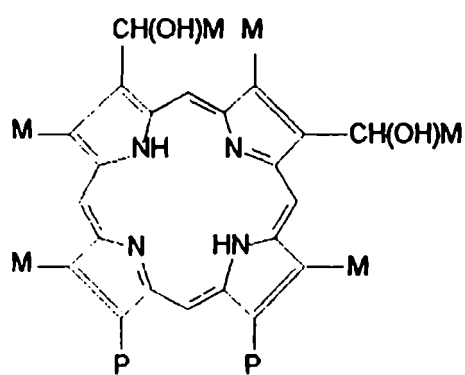


Figura 25: Estructura química de hematoporfirina.

P: $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$; M: CH_3

A mediados de los años cincuenta, Schwartz y col. (255) propusieron que la fluorescencia selectiva que se observaba en los tejidos malignos cuando se los irradiaba con luz ultravioleta después de la administración sistémica de HP podría deberse a impurezas en la preparación cruda más que a la HP en sí misma. Para mejorar la localización tumoral, es decir para enriquecer en la fracción responsable de la localización, se preparó el HPD (255, 256). Posteriormente, usando cromatografía de filtración por geles, se aisló una fracción enriquecida que es la principal responsable de las propiedades fotosensibilizantes del HPD (257). Esta fracción es conocida comercialmente con el nombre de Photofrin II.

Varios laboratorios han estado activamente abocados al análisis del HPD y del Photofrin II. Estos compuestos serían dímeros y oligómeros unidos por uniones éter y/o éster (258, 259). Photofrin II contiene grandes cantidades de oligómeros de HP unidos por uniones éter mientras que HPD parece tener una mayor proporción de uniones éster.

Las porfirinas presentes en HPD tienen un máximo de absorción alrededor de los 400 nm (banda de Soret) (257). Sin embargo, cuando se contempla la PDT *in vivo*, se debe tener en cuenta el hecho de que los tejidos atenúan más la luz en la banda de Soret que en la región de los 620 a 630 nm, siendo esta última la menor de las cinco bandas de absorción de las porfirinas.

Debido a la necesidad de incrementar la eficiencia de los fotosensibilizantes y para facilitar la penetración de la luz de excitación se han buscado fotosensibilizantes de segunda generación. Además de ser no tóxicos, los fotosensibilizantes efectivos deben absorber luz mas allá de los 630 nm, para lograr una efectiva penetración de la luz en el tejido, y deben permanecer en los tumores en mayor cantidad que en los tejidos normales para permitir necrosis selectiva.

Entre los fotosensibilizantes de segunda generación podemos nombrar: derivados de meso-tetrafenil-porfina, meso-tetra(o-acetamidofenil)porfina (TAc), derivados sulfonados de tetrafenilporfina (TPPS), porfirina c (el cromóforo libre de hierro del citocromo c), Zn-porfirina c, uro- y heptaporfirina I, porfirinas sintetizadas endógenamente a partir del precursor ALA, diéteres de HP, ésteres sintéticos de hematoporfirina-mesoclorina, bacterioclorofilina a y bacterioclorina a, derivados de clorina e₆, benzoderivado de protoporfirina IX, verdinas, ftalocianinas y metaloftalocianinas, derivados de purpurina y metalopurpurinas, porficeños (isómeros sintéticos de porfina), platirinas (compuestos tetrapirrólicos con un número impar de carbonos insertados alternativamente entre los anillos pirrólicos), derivados de silicona naftalocianina y texafirinas y metalotexafirinas (un nuevo tipo de macrociclos expandidos tipo porfirina) (255).

Inicialmente se utilizaron lámparas de tungsteno o arcos de xenón para proveer las altas intensidades de luz necesarias para PDT pero luego se comenzaron a utilizar lasers ya que así es más sencillo dirigir la luz al tumor. PDT no está restringida a tumores superficiales ya que el uso de fibras ópticas permite que la luz del laser pueda ser dirigida a las distintas partes del cuerpo (260). En la Figura 26 puede verse un esquema del sistema de fibras ópticas utilizado para PDT (261). El aparato consiste en un laser de ión argón utilizado para impulsar un laser de colorante con rhodamina B. La luz de 630 nm es dirigida dentro del tumor por una fibra de cuarzo con una aguja que ha sido insertada directamente en el tumor. Para luz de esta longitud de onda, la profundidad de penetración en el tejido es del orden de 2-3 mm, pero la profundidad de respuesta biológica accesible en el tumor es típicamente del orden de 1 cm. La dosis de luz óptima y la cantidad de droga administrada varía dependiendo del sitio a ser tratado.

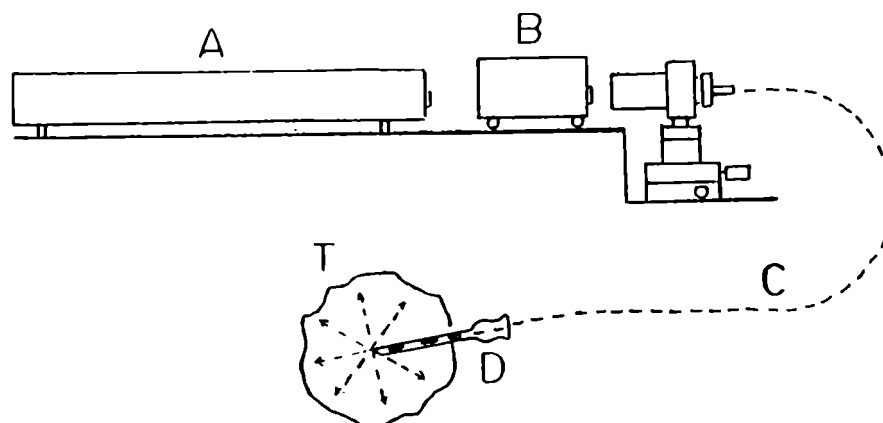


Figura 26: Dibujo esquemático del sistema utilizado para PDT intersticial.

A: laser de argón; B: laser de colorante; C: fibra de 200 μm ; D: aguja y T: tumor.

El mecanismo de acción fotodinámico (262) sería el siguiente: En la oscuridad, las moléculas del fotosensibilizante están casi siempre en el estado singulete; en este estado la molécula no tiene spins electrónicos desapareados ($^0\text{SENS}$). Al absorber un fotón, un electrón del fotosensibilizante es promovido a un orbital molecular superior sin cambio en su número de spin; así el primer estado excitado, al igual que el estado basal, es un singulete, $^1\text{SENS}$. Este estado tiene una vida media muy corta (aproximadamente 1-100 nseg). Los estados singuletes excitados pueden decaer al estado basal emitiendo calor o luz. Sin embargo, el estado singulete excitado de un fotosensibilizante efectivo sufre una rápida inversión de spin para dar un estado triplete metaestable, $^3\text{SENS}$, que posee dos electrones desapareados. Los estados tripletes de las moléculas fotosensibles tienen en general mayor vida media que los estados singuletes (microsegundos a segundos). Así, los sensibilizantes en estado triplete pueden colisionar con mayor número de moléculas y como resultado pueden mediar reacciones de fotosensibilización con mayor eficiencia. Estos procesos se muestran esquemáticamente en la Figura 27.

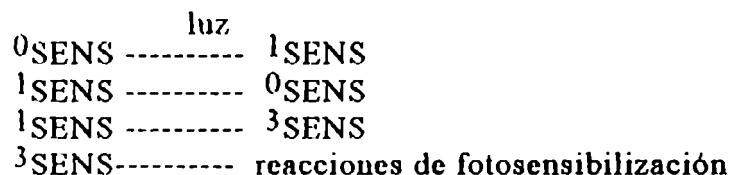
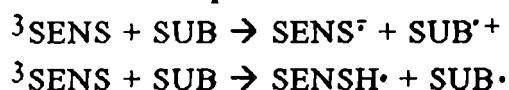


Figura 27: estados excitados de las moléculas fotosensibilizantes

El sensibilizante en su estado triplete puede reaccionar con moléculas adyacentes por un proceso de transferencia de un electrón (o un átomo de hidrógeno, reacción de tipo I) o por una reacción de transferencia de energía con oxígeno (reacción de tipo II) (Figura 28). En un dado sistema, ambos procesos pueden tener lugar al mismo tiempo. En las reacciones de tipo I, se forman radicales libres muy reactivos. En muchos casos los radicales reaccionan con el oxígeno para dar peróxidos y el anión radical superóxido. Estas reacciones son más eficientes con altas concentraciones de sustrato y bajas concentraciones de oxígeno. En las reacciones de tipo II, el sensibilizante en su estado triplete transfiere energía al oxígeno en su estado basal para dar oxígeno singulete que a su vez va a reaccionar con muchas biomoléculas para dar peróxidos, hidroperóxidos y sulfóxidos.

Reacciones tipo I:



Reacciones tipo II:

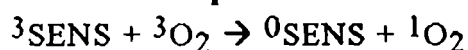


Figura 28: Mecanismos de fotosensitización tipo I (radical) y tipo II (oxígeno singulete). SENS: sensibilizante; SUB: sustrato

El tiempo de vida media del oxígeno singulete y la distancia de difusión en un ambiente celular, está limitado por su reactividad y por el enmascaramiento con constituyentes celulares como histidina, triptofano y colesterol. Moan (263) estimó que la distancia de difusión en la células sería de aproximadamente 0,1µm. Por lo tanto, el daño celular mediado por oxígeno singulete ocurriría cerca del sitio de generación y podría afectar virtualmente todos los componentes celulares. Los colorantes aniónicos lipofílicos provocarían daño de membranas en general, incluyendo las membranas plasmática, mitocondrial, lisosomal, nuclear

y retículo endoplásmico. La fotoperoxidación del colesterol de membrana y de otros fosfolípidos insaturados llevaría a cambios en la permeabilidad de la membrana, pérdida de fluidez, entrecruzamiento de aminolípidos y polipeptidos e inactivación de sistemas enzimáticos asociados a membrana y de receptores (264-266). La inactivación de los sistemas de transporte de membrana, la despolarización de la membrana plasmática y la inhibición de las enzimas de reparación de DNA precederían la inactivación de las enzimas mitocondriales, citosólicas y lisosomales (267, 268). Los fotosensibilizantes hidrofílicos se acumularían preferencialmente en lisosomas, y por lo tanto la ruptura de esas estructuras y la consecuente liberación al citoplasma de las enzimas hidrolíticas sería la principal causa de muerte celular (269).

Asociado con el daño de membrana está la liberación de mediadores inmunes e inflamatorios. Luego de la fotosensitización *in vitro*, se liberan una gran cantidad de eicosanoides a partir de todos los tipos celulares estudiados (270, 271). También histamina es liberada por PDT a través de la degranulación de mastocitos (272). Todas estas sustancias son potentes vasoactivos (ya sea vasoconstrictores o vasodilatadores) y existe evidencia que las implicaría en el desarrollo del daño vascular inducido por PDT. Estos daños vasculares son el efecto agudo más rápido y claro de PDT *in vivo*.

Una gran variedad de tumores han sido tratados con PDT en mas de 10.000 pacientes desde 1976. Entre las malignidades tratadas podemos mencionar: carcinomas bronquiales múltiples (273-275), tumores cutáneos, cáncer de lengua (276), carcinoma de boca (277), neoplasmas gastrointestinales inoperables (278), cáncer colorectal (279) y cáncer de vejiga (280).

La PDT ha sido fundamentalmente utilizada para tratar tumores avanzados y sólo recientemente se intentó tratar lesiones tempranas. En un estudio realizado en un multicentro japonés, PDT produjo remisión completa en todos los 78 pacientes con tumores de estómago, pulmón y vejiga con un diámetro inferior a 1cm (281). A pesar de que PDT es más adecuada para lesiones pequeñas, también sería efectiva en tumores avanzados y recurrentes ya que disminuye su tamaño. Esto ocurre aún en lesiones que no responden a los tratamientos convencionales (281).

La principal desventaja de esta terapia es la fotosensibilidad cutánea, la que puede durar hasta ocho semanas. Otra desventaja es que los lasers son caros y difíciles de operar. Es por esto que la investigación en este campo está dirigida fundamentalmente a la búsqueda de mejores fotosensibilizantes y mejores fuentes de luz.

OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo fueron:

- ❖ ***Determinar si existe alguna relación entre la presencia de tumores y el desencadenamiento de una porfiria.*** Para ello se exploró: a) el efecto sobre el camino metabólico del hemo de la presencia de tumores mamarios inducidos por N-nitroso N-metilurea (NMU) y de tumores hepáticos inducidos por dietilnitrosamina (DENA); b) la capacidad de estos tumores de modificar la respuesta de los animales a la droga porfirinogénica HCB; c) si había diferencias entre machos y hembras en la respuesta al HCB de los animales portadores de tumores hepáticos.
- ❖ ***Analizar la eficacia de uroporfirina I como localizante de tumores.*** Con este fin se comparó la captación por el tumor y la distribución tisular de URO I con la de un fotosensibilizante reconocido como es el derivado de hematoporfirina buscando mejorar la relación de concentraciones del fotosensibilizante entre el tumor y la piel ya que el principal problema de la terapia fotodinámica es la fotosensibilidad cutánea.
- ❖ ***Estudiar la capacidad para producir una alteración en el camino metabólico del hemo de varios agentes utilizados comunmente para el tratamiento de distintos cánceres, explorar la posible existencia de una relación estructura-función en cuanto a esta capacidad e investigar el mecanismo de acción porfirinogénica de estos compuestos, con el particular objetivo de ampliar el escaso conocimiento sobre la capacidad porfirinogénica de los antineoplásicos.*** Para cumplimentar este objetivo, se estudió el efecto de los antineoplásicos sobre la biosíntesis de porfirinas hepáticas, administrándole a los animales las drogas solas o en conjunción con DDC como modelo de porfiria latente. Considerando la alta porfirinogenicidad de ciclofosfamida en el embrión de pollo, se investigó su mecanismo de acción. Para ello se estudiaron varios parámetros del metabolismo del hemo y el contenido de citocromo P450. Asimismo, se estudió el efecto de un inductor y de un inhibidor del citocromo P450 sobre la inducción de ALA-sintasa producida por ciclofosfamida y se investigó la posibilidad de que el metabolito de ciclofosfamida, acroleína, fuera el responsable de su actividad porfirinogénica.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES

Sustratos

Glicina: Sigma Chemical Co. (USA)

Uroporfirina III, Mesoporfirina IX y Protoporfirina IX : Porphyrin Products. Logan, Utah (USA)

Porfobilinógeno: Sigma Chemical Co. (USA)

Drogas

HCB para el drogado de ratas fue de grado técnico, suministrado por Cía. Química, S.A. La composición de la droga fue 95% HCB y 5% de tetra y pentaclorobenzeno. N-nitroso-N-metilurea (NMU) fue sintetizada y purificada en el laboratorio de la Dra. Rosa Bergoc, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UBA y dietilnitrosamina (DENA) fue de Sigma Chemical Co. (USA).

Las siguientes drogas fueron gentilmente cedidas por distintos laboratorios: AIA por Hoffmann-La Roche, SKF-525A por Smith Kline & French, fenobarbital y dacarbazina por Bayer, melfalan, clorambucilo, busulfano y azatioprina por Wellcom Argentina, ciclofosfamida por Labinca Argentina, procarbazona y 5-fluorouracilo por Roche y hexametilmelamina por Rhodia Argentina. Tween 20 fue gentileza de Importadora Técnico Industrial.

DDC fue de Aldrich, dimetilsulfóxido (DMSO) fue de Sigma Chemical Co. y el derivado de hematoporfirina y uroporfirina I fueron de Porphyrin Products. Logan, Utah (USA)

Resina Dowex 1-X8, mesh 200-400 forma cloruro o acetato y resina Dowex 50-X8, mesh 200-400 forma ión hidrógeno, fueron fabricadas por Dow Chemical Co. USA y distribuidas por Sigma Chemical Co. USA, Sephadex G-25 fue fabricado por Pharmacia Fine Chemical Inc. y distribuido por Sigma Chemical Co. USA.

Las drogas usadas para preparar soluciones reguladoras y demás reactivos fueron de grado analítico, marca Carlo Erba, Mallinckrodt o Merck.

Solventes: Cloroformo C. Erba RPE, FU, o Mallinckrodt p.a., Metanol C. Erba FU, Acetato de etilo Atanor p.a., UVE para HPLC o C. Erba RPE, Acido acético glacial p. a. Atanor, Acido perclórico p.a. Mallinckrodt, n-Hexano C. Erba RPE y n-Heptano C. Erba RPE.

Equipos

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

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas Beckman J2-21 o Sorvall RC-5B, en centrífuga de mesa y en ultracentrífuga Beckman L8-55.

Para las determinaciones espectrofotométricas se usaron espectrofotómetros Shimadzu UV-3000 (doble longitud de onda-doble haz), Beckman DB o Metrolab Junior II.

Las mediciones de fluorescencia se realizaron en un espectrofotofluorómetro Aminco-Bowman.

Para la medición de actividad de PCL se utilizó un cromatógrafo líquido de alta presión Waters Associates con un detector de absorbancia modelo 440 usado a 404 nm, una bomba modelo 6000A y un inyector UGK.

METODOS

I- Tratamiento de los animales

I-1. Ratas

I-1.1. Ratas portadoras de tumores mamarios

Veinte ratas hembras endocriadas de la cepa Sprague-Dawley fueron divididas en cuatro grupos: a) Normal, b) tratadas con NMU, c) tratadas con HCB y d) tratadas con NMU y HCB. Las ratas de los grupos b y d recibieron NMU en tres inyecciones intraperitoneales sucesivas de 50 mg/kg de peso corporal cada una, administradas cuando las ratas tenían 50, 80 y 110 días de edad. Las ratas de los grupos c y d recibieron HCB (1 g/kg de peso corporal,) por intubación gástrica diariamente desde que tuvieron 120 días de vida. A esta edad, todas las ratas del grupo d tenían al menos un tumor. El HCB se administró como una suspensión (40 mg/ml) en agua conteniendo Tween 20 (0,5 ml/100 ml).

El desarrollo de los tumores fue monitoreado por palpación a lo largo de ambas cadenas mamarias y el control del crecimiento tumoral se verificó por medición con un calibre, tres veces a la semana.

Muestras de orina de 24 horas fueron recolectadas semanalmente, dos a cuatro días antes de la administración de HCB y a lo largo de todo el experimento. Todos los animales se sacrificaron por decapitación cuando tenían 150 días de vida. En todos los casos se removió una pequeña porción del tumor (aproximadamente 3 mm³) para su análisis histológico. Estas muestras fueron conservadas en formol 10%. Luego se fijaron en parafina, se cortaron en "slices", se tiñieron con el método de hematoxilina-eosina y se observaron con un microscopio óptico.

Se utilizó un grupo de diez animales para determinar el contenido de porfirinas y las actividades enzimáticas en glándula mamaria normal.

I-1.2. Ratas portadoras de tumores hepáticos

Se utilizaron ratas hembras y machos de la cepa BD VI a las cuales se les indujeron tumores hepáticos por administración de DENA.

Los animales de cada sexo fueron divididos en cuatro grupos: Normal, DENA, HCB Y DENA/HCB. Los animales de los grupos DENA y DENA/HCB recibieron DENA (3 mg/kg de peso) por intubación gástrica cinco días a la semana. Este tratamiento se realizó por diez semanas y desde que las ratas tenían cuatro semanas de edad. Veintidós semanas después de la última dosis de DENA, se extrajo sangre a las ratas de todos los lotes y se midió la actividad de PBG-deaminasa eritrocitaria. Los grupos HCB y DENA/HCB recibieron HCB (1 g/kg de peso) diariamente y por intubación gástrica. La droga, 40 mg/ml, fue suspendida en agua conteniendo Tween 20, 0,5 ml/100 ml y se administró durante cinco semanas desde que los animales tenía por lo menos 40 semanas de edad, es decir al menos 26 semanas luego de la última dosis de DENA (Figura 29). La orina de 24 horas de cada rata fue recolectada dos a cuatro días antes de comenzar el drogado con HCB y luego de comenzado el experimento todas las semanas.

Los animales fueron sacrificados por decapitación entre las 45 y 62 semanas de edad. Se removieron los tumores y los hígados e inmediatamente se los colocó en solución salina fría. En todos los casos se removió una pequeña porción de hígado y tumor de aproximadamente 3 mm³ para su examinación histológica. Estas muestras fueron procesadas como en I-1.1.

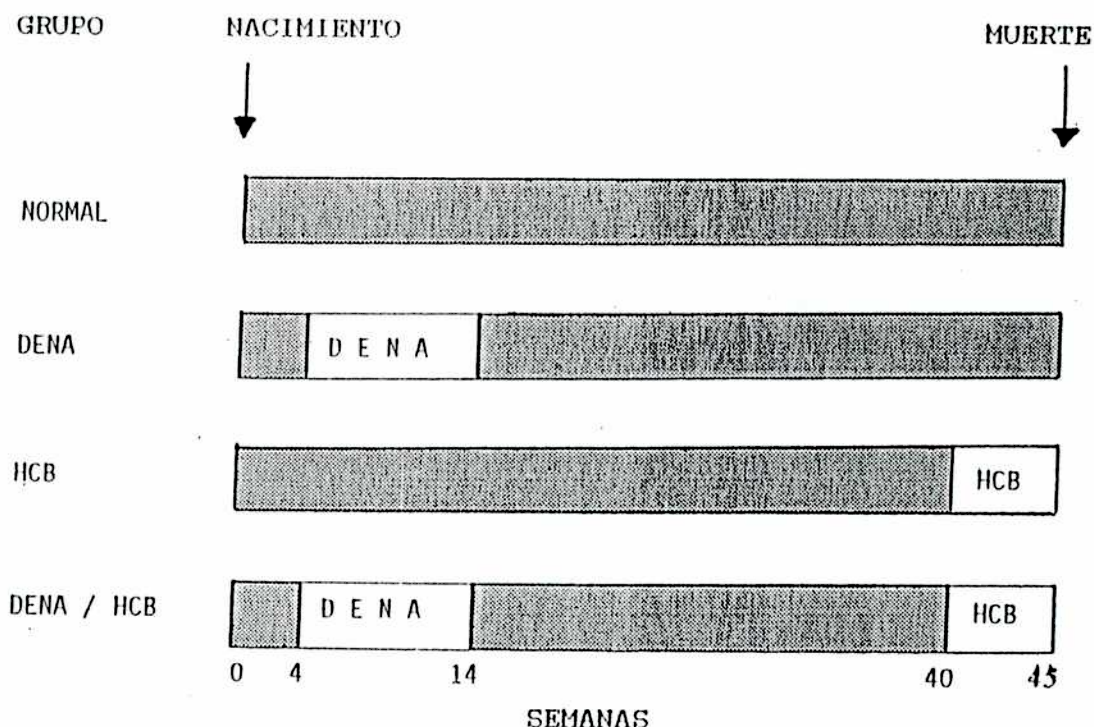


Figura 29: Tratamiento de los animales

I-1.3. Ratas tratadas con ciclofosfamida

Los animales utilizados fueron ratas hembras de la cepa Wistar de aproximadamente 200 g de peso.

La administración de ciclofosfamida se efectuó mediante inyección diaria e intraperitoneal de 10 mg/kg. Al cabo de 4 días, se suspendió el tratamiento y se continuó cuando el número de leucocitos volvió al nivel normal (lo que ocurrió luego de 10 días de la última dosis del antineoplásico). Al cabo de un mes se suspendió totalmente el tratamiento y se reanudó 2 meses más tarde. Durante todo el experimento se recogieron cada 15 días muestras de orina. Un lote de animales fue sacrificado al mes de iniciado el 2^{do} tratamiento y otro al cabo de 3 meses.

I-2. Ratones

I-2.1. Ratones portadores de tumores

El modelo tumoral fue un adenocarcinoma mamario (M3) que apareció espontáneamente en un ratón BALBc del Instituto de Oncología "Angel H. Roffo" (282). El tumor se mantuvo por pasajes sucesivos. Una porción de 1 mm³ del tumor se remueve de un ratón BALBc donador y se implanta subcutáneamente con un trocar en la axila de ratones hembras BALBc de 8 semanas de edad. Cuando los tumores tuvieron un diámetro aproximado de 0,5 cm, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 5 o 20 mg/kg de la porfirina. A los tiempos indicados en resultados los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se les extrajeron el hígado, los pulmones, los riñones, el tumor y una porción de piel. Un mínimo de cuatro ratones portadores de tumor fue utilizado en cada horario.

I-2.2 Ratones tratados con DDC y antineoplásicos

Los animales utilizados fueron ratones BALBc hembras y machos de 8 semanas de edad. Las drogas se inyectaron intraperitonealmente y los animales se sacrificaron por dislocación cervical 16 horas después. Los solventes utilizados para inyectar los compuestos fueron: aceite de maíz para DDC y azatioprina, solución fisiológica para ciclofosfamida y solución de HCl 0,1N llevada a pH 6 con NaOH para hexametilmelamina.

1-3. Embriones de pollo

Se utilizaron embriones de pollo de 17 días de la cepa White Leghorn adquiridos en la casa Alonso.

Para inyectar las drogas se hizo un pequeño orificio en la cáscara por encima de la cámara de aire. Con pipeta Pasteur estéril se colocaron 2 ó 3 gotas de solución fisiológica estéril para transparentar la membrana corioalantoica.

Las drogas se inyectaron en los líquidos que rodean al embrión en condiciones de esterilidad. Una vez que se inyectó la droga, el orificio de la cáscara del huevo se selló con cinta scotch y se incubó al embrión a 37-38°C en

cámara húmeda por 24 hs. para el análisis de porfirinas o el tiempo indicado en cada ensayo.

Cuando se completó el periodo de incubación los embriones fueron sacrificados por decapitación y el hígado entero se extrajo, se lavó con solución fisiológica, se secó y se pesó.

El compuesto en estudio se disolvió en el menor volumen de dimetilsulfóxido (DMSO) si era liposoluble o en solución fisiológica si era hidrosoluble. En el caso de melfalan, como la droga no pudo ser solubilizada en ningún solvente apropiado se la inyectó en forma de suspensión en solución salina. Ni el DMSO ni la solución fisiológica afectaron los parámetros medidos.

II- Determinación de ALA, PBG y porfirinas en orina

II-1. Metodología

Se utilizaron resinas de intercambio aniónico Dowex 1-X8 200-400 mesh, en forma acetato y resina de intercambio catiónico Dowex 50-X8 200-400 mesh en forma ión hidrógeno. Se utilizaron columnas de vidrio de 18 cm de largo por 1 cm de diámetro, con aproximadamente 2 ml de resina.

La técnica seguida fue esencialmente la de Mauzerall y Granick (283) ligeramente modificada y detallada por Wainstok de Calmanovici y col. (284).

Si la orina se encuentra a pH básico se ajusta a pH 4 con HCl concentrado, se agita para disolver los fosfatos presentes y se reajusta a pH 5,5-6 con solución saturada de acetato de sodio. Se siembra 1 ml de orina (o menos en el caso de la orina proveniente de animales muy porfiricos) en la columna aniónica y se lava con 6 ml de agua destilada. El percolado y los lavados, que contienen el ALA que no es retenido, se recogen juntos en un tubo.

Para eluir el PBG se utiliza acetato de sodio 1 N hasta que los líquidos recogidos den PBG negativo testeando en placa de toque con reactivo de Ehrlich. Una vez eluido el PBG, las porfirinas se eluyen con HCl 10% hasta no observar fluorescencia roja cuando se expone a la luz ultravioleta.

El ALA obtenido se transfiere a una columna con resina catiónica, se descarta el eluido, se lava con agua para eliminar la urea (con el reactivo de Ehrlich la urea da color amarillo) y por último se lava con 2 ml de acetato de sodio 0,5 M. Luego, el ALA se eluye con 8 ml de acetato de sodio 1 N y se lleva a 20 ml con buffer acetato 1 M pH 4,6.

II-2. Reactivo de Ehrlich

Se prepara con 1 g de 4-dimetil aminobenzaldehído, al cual se le agregan 30 ml de ácido acético glacial y 8 ml de ácido perclórico 70% completando a 50 ml con ácido acético glacial (283).

II-3. Determinación de PBG

Se determina en una alícuota de 1,5 ml a la que se agregan 1,5 ml de reactivo de Ehrlich. Luego de 10 minutos se lee la absorbancia a 555 nm.

II-4. Determinación de ALA

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

II-5. Cálculos para determinar ALA, PBG y porfirinas eluidas de las columnas

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

A_m = absorbancia de la muestra

A_b = absorbancia del blanco

E_M = $6,2 \times 10^4$ (285).

V_e = volumen final de la colorimetría

V_d = volumen eluido

V_a = volumen de la alícuota de la colorimetría

V_o = volumen de orina sembrado

Los cálculos para la determinación de ALA se realizan de la misma forma que para la determinación de PBG, siendo el E_M utilizado para el ALA pirrol de $6,2 \times 10^4$ (284).

El contenido de porfirinas totales se determinó leyendo la absorbancia de los extractos en la banda de Soret realizando la corrección de Allen para porfirinas según las fórmulas de Rimington y Sveinsson (286).

$$A_{\text{corr}} = (2 A_{\text{max}} - A_{380 \text{ nm}} - A_{430 \text{ nm}}) / \bar{K}$$

En estos casos se utiliza un coeficiente medio ($\bar{K}$) calculado en base a los coeficientes individuales de cada porfirina y a los % de cada una de ellas en la mezcla. En particular para porfirinas de orina se utiliza un $\bar{K}$ de 1,774 (284).

III- Extracción de porfirinas en distintos tejidos

Para extraer las porfirinas acumuladas luego del tratamiento de los animales con las distintas drogas porfirinogénicas, el tejido a analizar se homogeneizó en KCl 0,154 M en relación 1:5 p/v. Se tomó un volumen que osciló entre 0,1 y 1 ml de este homogenato (la cantidad tomada dependió de la fluorescencia del homogenato) y se desproteinizó con HCl (c) en cantidad suficiente para llevar a una concentración del 5% en este ácido. Luego se filtró por papel doble Whatman 42 y se lavó el precipitado hasta fluorescencia negativa con HCl 5%. Las porfirinas extraídas se determinaron espectrofotométricamente leyendo el máximo de absorción en la banda de Soret y la absorbancia a 380 nm y 430 nm como se detalla en el punto II-5 usando un $\bar{K}$ de 1,84 para ratas y ratones y de 1 para embriones de pollo.

Cuando se quiso analizar el contenido de HPD y de uroporfirina I en los ratones que habían sido inyectados con estas porfirinas, se probaron dos métodos: a) homogeneización y extracción con ácido perclórico 1N / metanol (1:1 v/v) como se describe en El Far y col. (287) y b) homogeneización en KCl 0,154 M y extracción con HCl 5% como se describió anteriormente con la diferencia que luego de desproteinizar con HCl (c) las muestras se calentaron en baño de agua a 100 °C por 10 min. y luego se filtraron.

De ambos métodos el que dio mejores resultados fue el método b y fue este último método el finalmente utilizado.

Las porfirinas se cuantificaron espectrofluorométricamente utilizando según el caso uroporfirina I o HPD en HCl 5% como estándar.

IV- Esterificación de porfirinas libres

Las porfirinas libres y secas (dsecador con CaCl_2 y NaOH) se esterificaron con 20 ml de metanol : ácido sulfúrico (19:1 v/v). La solución se dejó en oscuridad 24-48 hs a temperatura ambiente. Luego se extrajeron las porfirinas esterificadas utilizando cloroformo y ajustando el pH a 4,5 con acetato de sodio saturado. Se hicieron tres lavados con agua y todos los lavados se extrajeron con cloroformo hasta fluorescencia negativa.

El extracto clorofórmico final se filtró y concentró al vacío en baño maría y las muestras que contenían protoporfirina se evaporaron sin calentar con flujo de N_2 .

V- Separación de porfirinas metil éster

V-1. Cromatografía en capa delgada por el método de Doss (288)

Se utilizaron placas de sílica gel 60 F₂₅₄ de Merck de 0,25 mm de espesor.

Se lavaron sucesivamente con cloroformo : metanol 2:1 v/v y 1:2 v/v , se secaron y se reactivaron calentando a 80 °C por 30 min.

La corrida se realizó con benceno : acetato de etilo : metanol (85 : 13,3 : 1,5). La cromatografía se reveló con luz ultravioleta. Se marcaron las bandas, se raspó la sílica y se eluyeron con cloroformo. Se leyó la absorbancia en la longitud de onda de máxima absorción entre 400 y 410 nm. Se utilizaron los coeficientes de absorción de Salum y col. (289), para las porfirinas de 5 y 6 carboxilos se utilizaron valores aproximados calculados suponiendo una función lineal entre el número de carboxilos y la recíproca del coeficiente de extinción.

Los valores de la recíproca de los coeficientes usados fueron 5,6 para coproporfirina, 5,2 para pentaporfirina + hexaporfirina, 4,9 para firiaporfirina y 4,5 para uroporfirina.

V-2. Cromatografía líquida de alta presión

Las separaciones se realizaron como se describe en Billi de Catabbi y col. (99). Se utilizó una columna de $\mu\text{Porasil}$ (30 x 4 cm) y un sistema de solventes

acetato de etilo-n heptano (1:1 v/v) con un flujo de 1,5 ml/min y una presión de 700 psi. Las porfirinas como ésteres metílicos se cuantificaron usando curvas de calibración preparadas para varias porfirinas metil éster con diferente número de carboxilos. Se encontró una relación lineal entre el área debajo del pico y la cantidad de porfirinas, expresada como nmol, en el rango de : 0,01 - 0,15 nmol de penta- y hexaporfirina; 0,01 - 0,6 nmol de heptaporfirina y coproporfirina y 0,05 - 1,4 nmol de uroporfirina. Los coeficientes de proporcionalidad (área/nmol) fueron 21 y 10,8 (uroporfirina metil éster); 21,5 y 10 (heptaporfirina metil éster); 20 y 11 (hexaporfirina metil éster); 25,4 y 12 (pentaporfirina metil éster); y 19 y 9,5 (coproporfirina metil éster) para escala completa de absorbancia de 0,05 y 0,1 respectivamente.

VI- Medición de la actividad de ALA-sintasa

VI-1. Rata

Aproximadamente 1 g de tejido se homogeneizó con solución que contiene buffer Tris-HCL 10 mM (pH 7,4), NaCl 0,9% y EDTA 0,5 mM de tal forma de obtener 3 ml de homogenato/g de hígado. La actividad de ALA-sintasa se ensayó en los homogenatos por el método de Marver y col.(6). La mezcla de incubación contiene 0,5 ml de homogenato, 0,5 ml de glicina 0,4 M, 0,2 ml de EDTA 0,1 M, 0,8 ml de buffer Tris-ClH 0,2 M (pH 7,2) en un volumen final de 2 ml.

Se incubó a 37°C durante 1 h al aire y con agitación. Se desproteinizó con 0,5 ml de TCA 25% en frío y se centrifugó a 2500 rpm en centrífuga de mesa por 15 min.

El sobrenadante se llevó a pH 4,6 con NaOH 5 N. Se realizaron ensayos blancos donde se puso primero el TCA y luego el homogenato.

Se pirrolizó el ALA usando 1 ml de mezcla incubada con 1 ml de buffer acetato de sodio 0,1 M pH 4,6 y 0,05 ml de acetilacetona calentando a 100°C por 10 min. Luego de realizar la colorimetría con el reactivo de Ehrlich se leyó la absorbancia a 555 nm utilizando un E_M de $6,2 \times 10^4$.

VI-2. Embrión de pollo

Se homogeneizaron los hígados por separado con solución que contiene buffer Tris-HCL 10 mM (pH 7,2), NaCl 0,9% y EDTA 0,5 mM de tal forma de

obtener 4 ml de homogenato/g de hígado. La actividad de ALA-sintasa se ensayó en los homogenatos por el método de Marver y col.(6). La mezcla de incubación contiene 0,5 ml de homogenato, glicina 0,075 M, EDTA 0,01 M, buffer Tris-ClH 0,06 M (pH 7,2), fosfato de piridoxal 150 μ M en un volumen final de 2 ml.

Se incubó a 37°C durante 1 h al aire y con agitación. Luego se siguió igual procedimiento que en VI-1.

VII- Determinación de la actividad de PBG-deaminasa

VII-1. Hepática y tumoral

El tejido se homogeneizó con KCl 0,154 M (1g de tejido se llevó a 5 ml) y se centrifugó a 11000 g por 20 min.

Para la determinación de la actividad de PBG-deaminasa, la mezcla de incubación contenía (en 1,2 ml) 0,067 M de buffer fosfato de sodio (pH 8,1), porfobilinógeno 0,016 mM y 0,1 ml del sobrenadante postmitocondrial de las ratas normales o tratadas con DENA o los eluidos de Sephadex G25 provenientes del sobrenadante postmitocondrial de los hígados de las ratas porfíricas. Las muestras fueron incubadas aeróbicamente a 37° C por 60 min. en la oscuridad y con agitación. La incubación fue detenida por el agregado de 0,2ml de HCl (c). Se dejó en frío durante 1 hora y a la luz y luego se centrifugó a 3000 g por 10 min. (284). La cantidad de uroporfirina sintetizada fue determinada con un espectrofotofluorómetro Aminco-Bowman, fijando como longitud de onda de excitación 405 nm y de emisión 596 nm y usando uroporfirina III como estándar.

VII-2. Eritrocitaria

La sangre de rata fue obtenida de la vena orbital de atrás del ojo mediante una pipeta pasteur heparinizada introducida por el rabo del ojo.

La actividad de PBG-deaminasa eritrocitaria se determinó de acuerdo al método de Magnussen y col. (290). La sangre se centrifugó para separar los glóbulos rojos y luego de remover el plasma y la capa de linfocitos, los eritrocitos fueron lavados dos veces con solución salina fría. Los eritrocitos lavados se suspendieron luego en un volumen de agua y posteriormente se los sometió tres veces a un proceso de congelamiento y descongelamiento.

Posteriormente, la suspensión de eritrocitos rotos fue diluida 45 veces con buffer Tris HCl 0,05 M pH 8,2. La mezcla de incubación contenía: 0,5 ml de la suspensión de eritrocitos, 0,9 ml de buffer Tris HCl 0,05 M pH 8,2 y 0,1 ml de porfobilinógeno 0,45 mM. La mezcla se incubó con agitación a 37°C en oscuridad por una hora. La incubación se paró por agregado de 1,5 ml de TCA 25% seguido por centrifugación. La cantidad de uroporfirina sintetizada se determinó como en VII-1 pero en este caso se utilizó como estándar una solución de uroporfirina III en TCA 12,5%. La actividad se expresó en nmoles de porfirina producida / mg de proteína por hora.

VIII- Medición de la actividad de porfirinógeno carboxi-liasa

VIII-1. Preparación de amalgama de sodio

Se siguió la técnica descrita por San Martín de Viale (291). Quince gramos de Hg se calentaron a 30-40 °C en cápsula de porcelana, con una varilla larga con punta estriada se pincharon pequeños trozos de Na recién cortados (secándolo del kerosene con papel de filtro) y se adicionó 1 g de Na al Hg. Todo el procedimiento se realizó bajo campana teniendo precaución por las posibles proyecciones.

El amalgama, que se endurece al enfriar, se guardó en frasco bien seco bajo cloruro de calcio.

VIII-2. Preparación del uroporfirinógeno

Se utilizó la metodología de Fisher y Stern (292) y Mauzerall y Granick (76). La porfirina libre disuelta en NaOH 25 mM se redujo con amalgama de sodio (0,2 a 1 g/ml) recientemente pulverizada. La decoloración de la solución y pérdida de fluorescencia evidenció la reducción a porfirinógeno. Se filtró con vacío a través de una placa filtrante de poro fino. El pH de la solución se ajustó a 7-7,2 con H₃PO₄ 40% p/v bajo N₂. Dado que el estado reducido es inestable, se trabajó bajo tenue luz roja y se usó inmediatamente.

VIII-3. Preparación enzimática, medio de incubación y expresión de resultados

El tejido se homogeneizó con KCl 0,154 M (1g de tejido se llevó a 5 ml) y se centrifugó a 11000 g por 20 min. Los sobrenadantes de homogenatos con alto contenido de porfirinas se pasaron a través de columnas de Sephadex G25 con buffer fosfato de potasio 0,134 M pH 7,0. Se reunieron los eluidos sin fluorescencia y se usaron como preparación enzimática. El medio de incubación consistió en buffer fosfato de potasio 0,067 M pH 6,8; glutatión reducido 10^{-3} M, EDTA 10^{-4} M, uroporfirinógeno III 2 μ M y preparación enzimática en un volumen final de 3 ml. La reacción se realizó en tubos de Thunberg en anaerobiosis a 37°C y oscuridad durante 30 minutos y se detuvo reoxidando el porfirinógeno en presencia de luz y desproteinizando con HCl concentrado en una concentración final de 5% en frío (203). Los incubados se filtraron por papel SS 595 y los tubos se lavaron con HCl 5% hasta fluorescencia negativa. Los extractos de HCl se secaron en desecador, las porfirinas se esterificaron y pasaron a cloroformo y luego se separaron por HPLC. La cantidad de proteína incubada fue de aproximadamente 9 μ g. La actividad enzimática fue medida por la suma de todos los productos de decarboxilación: hepta- + hexa- + penta- + coproporfirina formadas/30 min. por mg de proteína (primera etapa: decarboxilación del uroporfirinógeno) y por la formación del producto final de decarboxilación: coproporfirina formada/30 min. por mg de proteína (segunda etapa: formación de coproporfirinógeno) (201).

IX- Medición de la actividad de protoporfirinógeno oxidasa

IX-1. Preparación del protoporfirinógeno

Se utilizó la metodología de Brenner y Bloomer (293). Una solución stock de protoporfirina 1,5 mM disuelta en 0,01 M de KOH conteniendo 20% (v/v) de etanol se diluyó a 0,2 mM con etanol-KOH. Esta solución se redujo con amalgama de sodio (preparada como en VIII-1) en una concentración de 2 g/ml. La decoloración de la solución y pérdida de fluorescencia evidenció la reducción a porfirinógeno, lo que ocurrió en 2-3 minutos. Se filtró con vacío a través de una placa filtrante de poro fino. El pH de la solución se ajustó a 8 con H_3PO_4 40% p/v bajo N_2 . Dado que el estado reducido es inestable, se trabajó bajo tenue luz roja y se usó inmediatamente.

IX-2. Preparación enzimática, medio de incubación y expresión de resultados

La actividad de protoporfirinógeno oxidasa se determinó de acuerdo al método de Brenner y Bloomer (293). El tejido se homogeneizó en una solución que contenía sacarosa 0,25 M y Tris HCl pH 7,4 0,05M en una relación 10% (p/v). El homogenato se centrifugó a 700 g por 15 minutos, se descartó el precipitado y el sobrenadante se centrifugó a 11000 g por 15 minutos. Las mitocondrias así obtenidas se lavaron dos veces y se resuspendieron en buffer Tris HCl 0,02 M pH 8,7. Finalmente se sonicaron tres veces por 20 segundos en presencia de Tween 20 (20 mg/ml).

La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 1,5 ml, glutathion reducido 5 mM, EDTA 100 mM, Tris HCl pH 8,7 100 mM, 20 mg de Tween 20, 50 μ M de protoporfirinógeno y la preparación tisular (0,7-0,9 mg de proteína). El blanco de reactivos consistió en la mezcla de incubación estándar sólo que en lugar de protoporfirinógeno se agregó solución de KOH-etanol. Para el control no enzimático, la preparación tisular fue previamente calentada a 75°C por 15 min. Para el estándar de protoporfirina, el protoporfirinógeno fue reemplazado por 5 μ M de protoporfirina.

El ensayo se inició agregando el protoporfirinógeno a la preparación enzimática y al control no enzimático. Se incubó a 37°C en oscuridad y sin agitación. Cada 10 minutos, se tomaron alícuotas de 0,1 ml y se agregaron a una mezcla de medición que contenía, en un volumen final de 2,9 ml, glutathion reducido 5 mM, EDTA 1 mM y Tris HCl pH 8,7 100 mM. La protoporfirina formada se leyó espectrofluorométricamente fijando como longitud de onda de excitación 405 nm y de emisión 635 nm. La concentración de protoporfirina en la muestra y en el control no enzimático se determinó por comparación con el estándar de protoporfirina.

X- Medición de la actividad de ferroquelatasa

X-1. Rata

La actividad de ferroquelatasa se determinó en las fracciones mitocondriales. El tejido se homogeneizó en KCl 0,154 M (1g de tejido se llevó a 5 ml), se centrifugó a 700 g por 15 minutos y el sobrenadante así obtenido se centrifugó a 11000 g por 20 min. El pellet obtenido luego de esta última

centrifugación se lavó con un pequeño volumen de KCl 0,154 M y se volvió a centrifugar a 11000 g por 20 min. Las mitocondrias así obtenidas se congelaron a -20°C por 24-48 hs antes de ser utilizadas.

La solución de mesoporfirina IX, utilizada como sustrato, se preparó según lo describen Porra y col. (294). La porfirina se disolvió en un pequeño volumen de NH₃ 2 N. La solución resultante se diluyó con un poco de agua, se llevó a pH 8,2 con HCl y se agregó buffer Tris HCl pH 8,2 . Finalmente se agregaron 0,2 volúmenes de Tween 80 1% (p/v). Para conocer la concentración de la solución se hizo una dilución conveniente con HCl 0,1 N y se midió la absorbancia a 399 nm. Se utilizó un E_{mM} de 445 (295).

Para determinar la actividad de ferroquelatasa, el medio de incubación contenía en un volumen final de 3,2 ml: 200 nmoles de mesoporfirina IX, 200 nmoles de CoCl₂, 30 µmoles de succinato de sodio, 140 µmoles de buffer Tris HCl pH 8,2 y la suspensión de las mitocondrias correspondientes a 7 mg de proteínas microsomales.

Se incubó a 37 °C durante 1 h en oscuridad. Al finalizar la incubación se adicionaron en frío 1 ml de piridina, 0,5 ml de NaOH 1 N y 1 ml de agua. La mezcla se dividió en dos cubetas, en una se agregó una punta de espátula de Na₂S₂O₄ y en la otra 0,05 ml de K₃Fe(CN)₆ 3 mM y se midió la diferencia de absorbancia del hemocromógeno oxidado y reducido (296).

La formación de producto fue calculada de la ecuación :

$$\text{cobaltomesoporfirina (nmoles)} = 1000 \times V \times (A_{551\text{nm}} - A_{535\text{nm}}) / \Delta E_{\text{mM}}$$

donde V es el volumen (ml) de la solución alcalina de piridina y (A_{551nm}-A_{535nm}) representa la diferencia de absorbancia entre el máximo de la banda α (551 nm) y el mínimo entre las bandas α y β (535 nm). El valor usado para ΔE_{mM} fue de 12,5 (295).

X-2. Embrión de pollo

La actividad de ferroquelatasa fue medida según una modificación del método de Cole y col. (297). Los hígados se homogeneizaron en KCl 0,154 M. A partir de 1 g de hígado se obtuvieron 5 ml de homogenato. Este se centrifugó a 11000 g por 20 min. El pellet obtenido se lavó con un pequeño volumen de KCl 0,154 M y se volvió a centrifugar a 11000 g por 20 min.

Para determinar la actividad de ferroquelatasa, el medio de incubación contenía en un volumen final de 3,5 ml: 150 nmoles de mesoporfirina IX, 120 nmoles de FeSO_4 , 12 μmoles de ditioneol, 100 μmoles de buffer Tris HCl pH 8,2 ; 0,3 ml de Tween 80 1% (p/v), 0,3 ml de etanol y la suspensión de las mitocondrias correspondientes a 0,2 g de hígado aproximadamente. Antes de incubar se hizo vacío durante 5 minutos.

Se incubó a 37 °C durante 1 h en oscuridad y con agitación. Al finalizar la incubación se adicionaron en frío 1 ml de piridina, 0,5 ml de NaOH 1 N y 1 ml de agua. Se siguió igual procedimiento que en X-1 pero como en este caso el producto formado fue hierromesoporfirina en lugar de cobaltomesoporfirina se midió la absorbancia a 547 y 531 nm usando un ΔE_{mM} de 21,7 de acuerdo con Porra y Jones (296).

XI- Medición del contenido de citocromo P450 microsomal

El tejido se homogeneizó en KCl 0,154 M en una relación 1g de tejido/5ml de KCl 0,154 M y se centrifugó a 11000 g por 20 minutos. El pellet conteniendo la fracciones mitocondriales y nucleares se descartó. El sobrenadante se centrifugó por 1 hora a 105000 g. El pellet microsomal resultante se lavó con KCl 0,154 M y se volvió a centrifugar por 1 h. a 105000 g. Los microsomas así obtenidos se congelaron a -70°C por 24-48 hs. Luego se suspendieron en buffer fosfato de potasio 0,134 M pH 7,0 en una concentración de 1mg de proteína / ml.

El contenido de citocromo P-450 microsomal se determinó espectrofotométricamente según el método de Omura y Sato (298) usando un Shimadzu UV-3000, longitud de onda dual. Se midió el espectro de diferencia entre las muestras reducidas con ditionito de sodio, con CO y sin CO. La diferencia de absorbancia entre 450 nm y 490 nm se convirtió a nmoles de citocromo P450 con el coeficiente de extinción molar de $91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

XII- Estimación del contenido de hierro total

Alícuotas de 1 ml de homogenato total fueron secadas en estufa y calcinadas a 550 °C con sucesivas diluciones en agua. Luego de la desaparición de la materia orgánica, el hierro fue disuelto en HCl 20% y su concentración fue determinada por la reacción colorimétrica con o-fenantrolina e hidroquinona. Se

pipeteó 1 ml de muestra y se agregó 1ml de citrato de sodio 25% para llevar a pH 3,5; 2 ml de o-fenantrolina 0,25% y 1 ml de hidroquinona 1% y se leyó la absorbancia a 508 nm después de 1 hora de agregados los reactivos (299).

XIII- Recuento de leucocitos

La sangre fue obtenida de la vena orbital de atrás del ojo mediante un tubo capilar introducido por el rabo del ojo. Como anticoagulante se utilizó EDTANa₂ (5 mg/ml de sangre).

Un volumen de 20 µl de sangre se escurrió en 0,38 ml de líquido de dilución (ácido acético 3% (v/v) y 5 gotas de solución de violeta de genciana al 1%). El recuento celular se realizó microscópicamente utilizando un objetivo seco de 40x y un ocular de 10x. Se contaron los leucocitos ubicados en los 4 cuadrados grandes de las esquinas de la cámara de Neubauer.

El cálculo del n° de leucocitos se realizó mediante la siguiente expresión :

$$\text{Leucocitos/litro} = N \times \frac{1}{4} \times 10 \times 20 \times 10^6$$

N: leucocitos contados en los 4 cuadrados

10: factor de profundidad de la cámara

20: factor de dilución

XIV- Determinación de proteínas

Las proteínas se determinaron por el metodo de Lowry y col. (300), usando como estándar albúmina sérica bovina.

XV- Tratamiento estadístico de los resultados

Se utilizó el test "t" de Student salvo en el caso de las ratas portadoras de tumores mamarios en el cual se utilizó el test U no paramétrico de Mann-Whitney.

RESULTADOS

CAPITULO I

EFECTO DE TUMORES MAMARIOS SOBRE LA PORFIRIA INDUCIDA POR HCB EN RATAS

El objetivo esta primera etapa del trabajo de tesis fue estudiar la biosíntesis de porfirinas en tumores mamarios y en el hígado de los animales portadores de dichos tumores. Asimismo se investigó la respuesta de estos animales portadores de tumores a la acción de la droga porfirinogénica HCB.

Para inducir los tumores mamarios se utilizó N-nitroso-N-metilurea (NMU). NMU es carcinogénico en varias especies animales: ratón, rata, hamster, conejillo de indias, conejo, cerdo, perro y mono e induce tumores benignos y malignos en distintos sitios dependiendo de la vía de administración (301). Gullino y col. (302) fueron los primeros en describir la inducción por NMU de carcinomas mamarios en ratas como modelo de cáncer mamario humano. Este modelo es útil para estudiar carcinomas mamarios humanos por sus características de hormono dependencia y su capacidad de generar metástasis (303). Estos tumores frecuentemente sufren regresión luego de la ovariectomía de los animales portadores (304) y contienen receptores a estrógenos, progesterona y prolactina (303).

En el presente trabajo se utilizó como modelo experimental de tumores mamarios inducidos por NMU el descripto por Rivera y col. (305). Los animales utilizados fueron 20 ratas hembras endocriadas de la cepa Sprague-Dawley. Las ratas fueron divididas en 4 grupos: a) normal, b) tratadas con NMU, c) tratadas con HCB y d) tratadas con NMU y HCB. En todos los grupos se midió la excreción urinaria de precursores y porfirinas, el contenido de porfirinas y la actividad, en hígado y tumor, de ALA-sintasa (enzima regulatoria) y de PCL (enzima blanco de la acción del HCB). Los detalles del tratamiento de los animales y las determinaciones se describen en Métodos.

I-1. Histopatología del tumor

Todos los animales inyectados con NMU desarrollaron tumores mamarios (Figura 30) mientras que los animales controles no desarrollaron tumores espontáneos en ningún caso. Las ratas inyectadas con NMU desarrollaron un promedio de 2,4 tumores mamarios por animal. Estos tumores alcanzaron aproximadamente 1 a 2 cm de diámetro en el momento del experimento. Desde el punto de vista anatomopatológico, todas las lesiones estudiadas fueron carcinomas ductales derivados del epitelio glandular con distinto grado de atipia celular y apariencia adenomatosa. La mayor parte de las lesiones fueron de la variedad adenocarcinoma cribiforme aunque también se observaron del tipo adenocarcinoma sólido, comedocarcinoma o variedad papilar (Figura 31). En todos los casos se observó diferente grado de infiltración por mastocitos, linfocitos, eosinófilos y

polimorfonucleares. Los hígados y los pulmones de los animales control y de aquellos tratados con HCB mostraron su estructura conservada mientras que aproximadamente un 10% de los animales inyectados con NMU mostraron metástasis pulmonar o hepática.

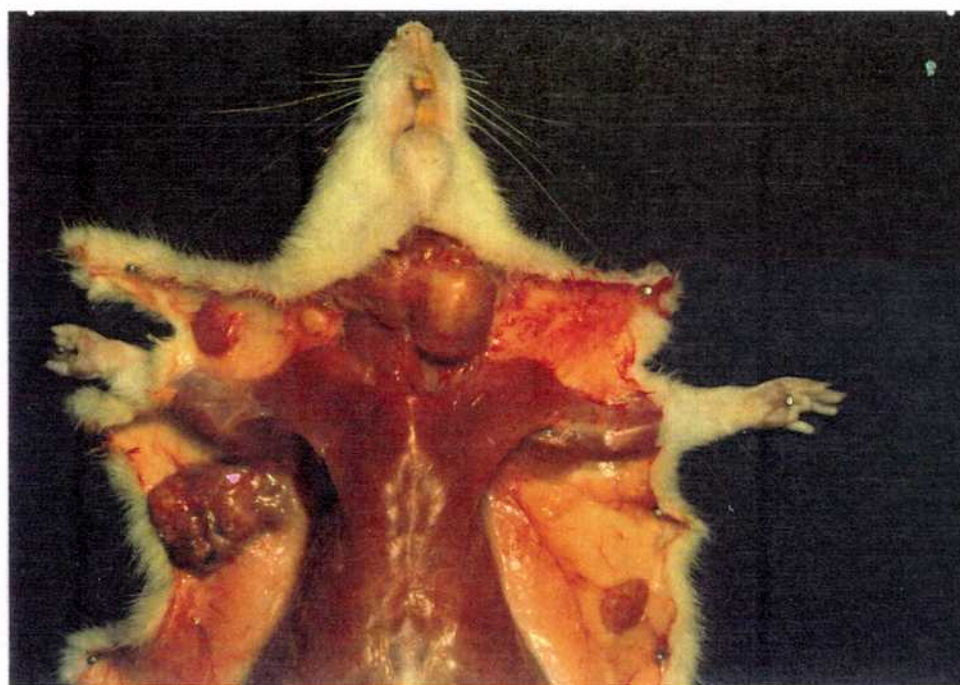


Figura 30: Fotografía de rata hembra Sprague-Dawley mostrando tumores mamarios inducidos por NMU.

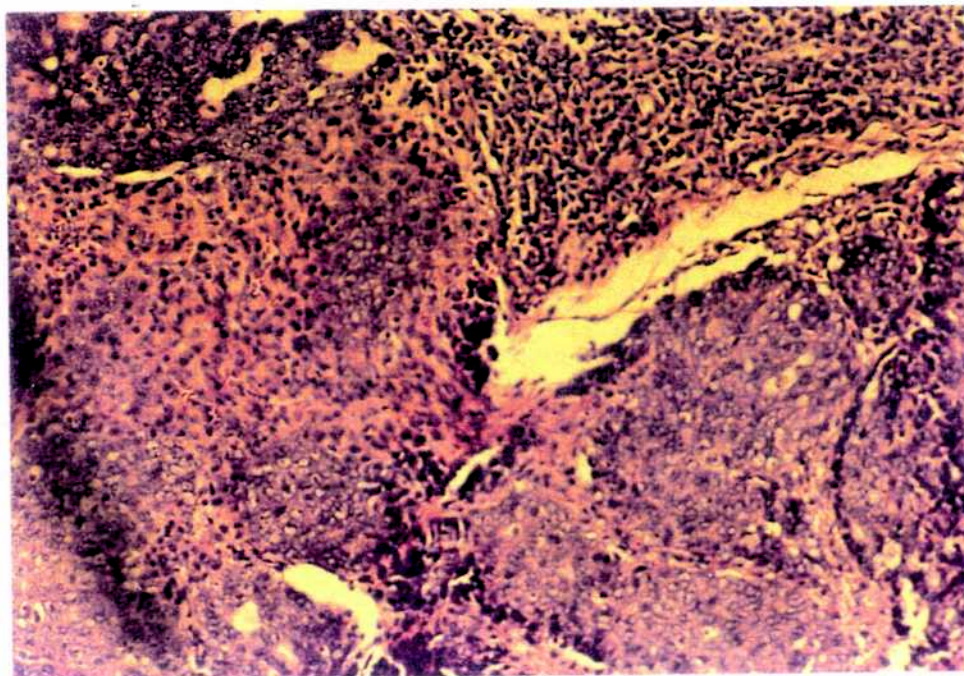


Figura 31: Carcinoma cribiforme con áreas sólidas y escasa necrosis intratumoral. Coloración con hematoxilina-eosina. Aumento 320x.

I-2. Excreciones urinarias de ALA, PBG y porfirinas

El valor promedio de excreción de ALA, PBG y porfirinas en los animales portadores de tumores (lote NMU) (Figura 32 a, b y c) estuvo dentro del rango de los valores normales (área sombreada).

En la Figura 32 (a) puede observarse que el lote tratado con HCB mostró excreciones normales de ALA a lo largo de todo el experimento. En el lote de ratas tratadas con NMU+HCB se observa que después de tres semanas de intoxicación con HCB dos animales comenzaron a excretar más ALA que los normales alcanzando una excreción de aproximadamente 400 μg ALA/24 hs alrededor de la cuarta semana.

La excreción de PBG (Figura 32 b) para el lote de animales no portadores de tumores que recibieron HCB fue normal excepto por un animal que excretó 27,3 μg de PBG/24 hs en la cuarta semana. Sin embargo, la administración de HCB a los animales portadores de tumores (lote NMU+HCB) provocó un incremento de 930 veces en la excreción de PBG (comparado con las ratas normales). Este incremento se observó a partir de la segunda semana de tratamiento con HCB alcanzando valores tan altos como 2800 μg /24 hs.

Como puede verse en la Figura 32 (c), los animales no portadores de tumores tratados con HCB no mostraron niveles incrementados de porfirinas urinarias mientras que aquellos que recibieron NMU+HCB comenzaron a superar los valores normales a partir de la segunda semana llegando un animal a excretar 250 μg de porfirinas/24 hs.

I-3. Acumulación hepática de porfirinas

En la Figura 33 puede observarse el contenido de porfirinas en el hígado de los animales tratados y los controles. Las ratas portadoras de tumores (lote NMU) mostró un contenido hepático de porfirinas similar al de los animales normales. La administración de HCB aumentó significativamente el contenido de porfirinas hepáticas en los dos lotes que recibieron el fungicida (lotes HCB y NMU+HCB) aunque hay que destacar que la administración de HCB a ratas portadoras de tumores produjo una acumulación de porfirinas hepáticas mayor ($p < 0,05$) que la observada en los animales tratados sólo con el fungicida.

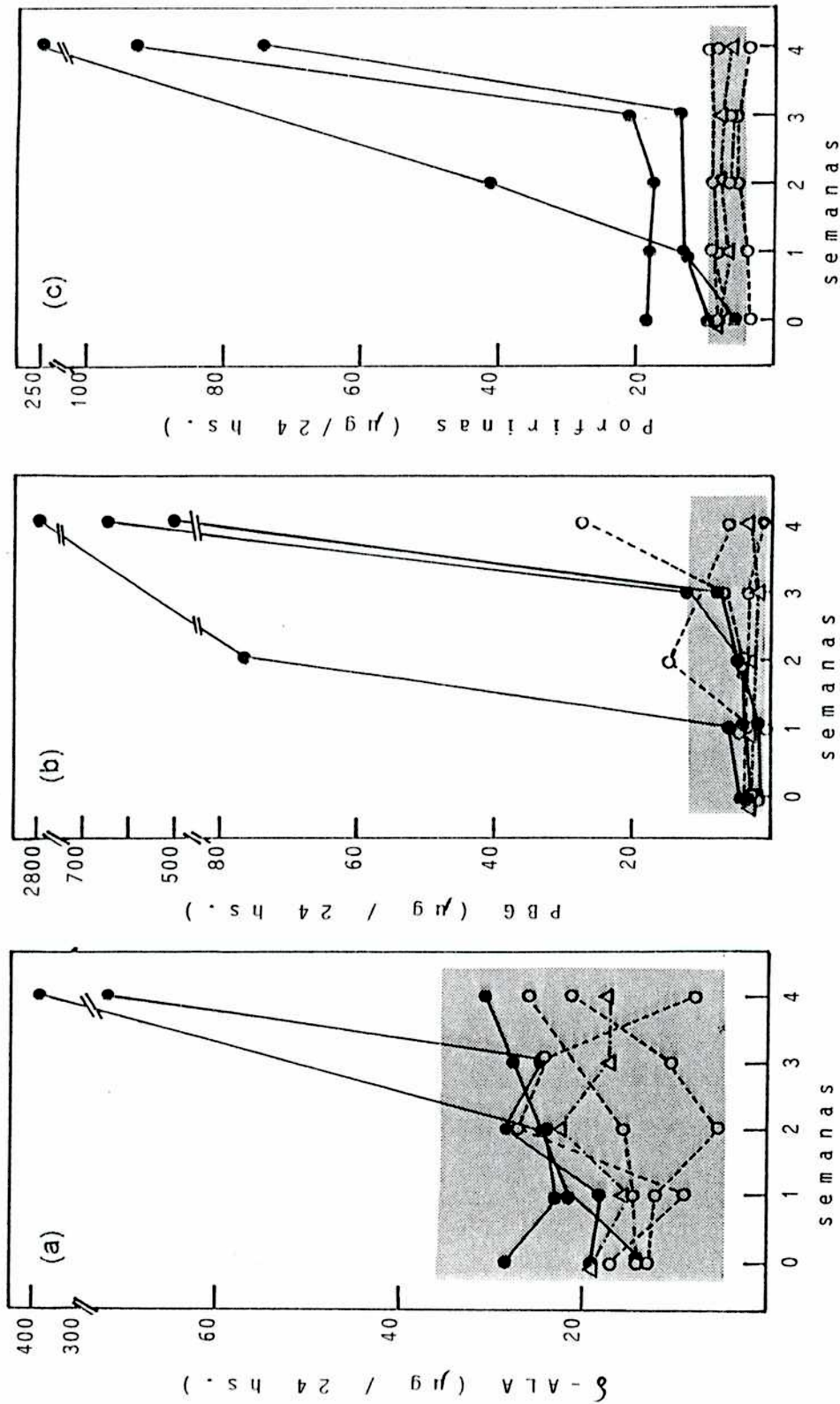


Figura 32: Excreción urinaria de ALA (a), PBG (b) y porfirinas (c) de ratas normales y tratadas. Cada punto representa la excreción de ratas individuales y representativas de los grupos HCB (O) y NMU + HCB (Δ). Para el lote NMU (Δ) se representa el promedio de cinco animales y el rango normal se representa por el área sombreada.

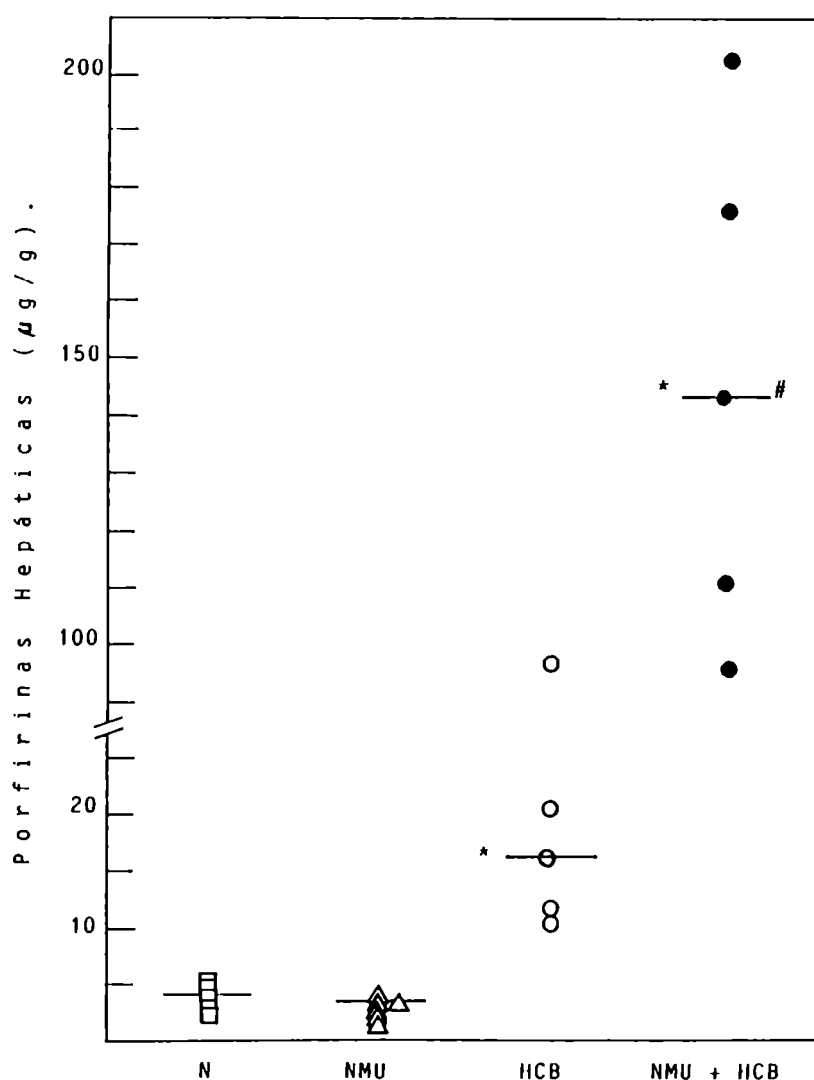


Figura 33: Contenido de porfirinas hepáticas en animales normales y tratados. Cada punto representa el valor correspondiente a un animal individual de cada grupo. Para cada grupo la mediana se representa por (----).

* $p < 0,01$: estadísticamente significativo respecto a su control (para el lote HCB se tomó como control el grupo de ratas normales y para el lote NMU+HCB se consideró como control el lote NMU) y # $p < 0,05$: estadísticamente significativo respecto al lote HCB.

I-4. Contenido de porfirinas en tumores

En la Figura 34 puede observarse el contenido de porfirinas en glándula mamaria normal y en tumores mamarios. Las glándulas mamarias normales

mostraron un contenido de porfirinas muy bajo cuando se comparó con el contenido de otro tejido normal como el hígado (Figura 33).

A pesar que el tumor desarrollado por el tratamiento con NMU mostró un contenido de porfirinas mayor que el de glándulas mamarias normales, los niveles en ambos casos fueron bajos (Figura 34). A diferencia de lo que ocurrió en el hígado de los animales portadores de tumores (Figura 33), el tumor no acumuló porfirinas luego del tratamiento con HCB (Figura 34).

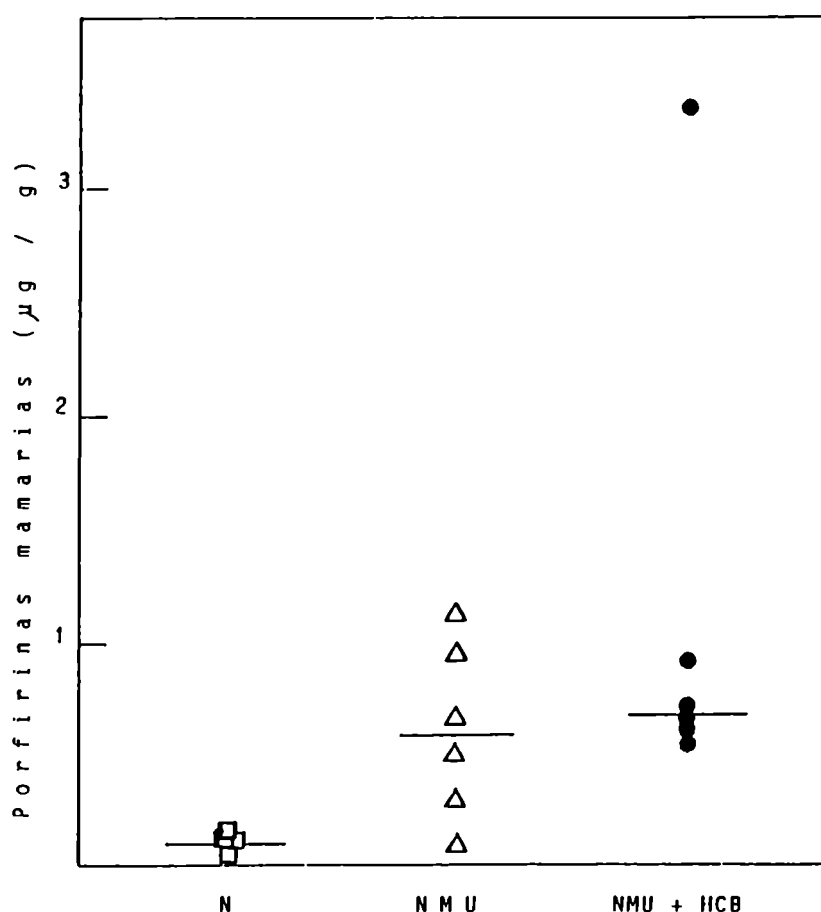


Figura 34: Efecto del HCB sobre el contenido de porfirinas en tumor. Cada punto representa el valor correspondiente a un animal individual de cada grupo de animales. N representa glándula mamaria normal. Para cada grupo la mediana se representa por (----).

I-5. Actividad de ALA-sintasa hepática

La Figura 35 muestra que los animales portadores de tumores mamarios (lote NMU) poseían una actividad de ALA-sintasa hepática similar al grupo normal. La actividad de esta enzima se incrementó significativamente ($p<0,01$) en los animales tratados con ambas drogas cuando se comparó con su control (NMU). El HCB por sí sólo también incrementó la actividad de ALA-sintasa con respecto a su control (Normal) pero este incremento no fue estadísticamente significativo. Estos resultados muestran que el incremento producido por el HCB sobre la actividad de ALA-sintasa fue mayor cuando el fungicida se administró a los animales portadores de tumores.

I-6. Actividad de PCL hepática

En la Figura 36 puede observarse la primera y segunda etapa de actividad de la enzima blanco de la acción del HCB, en el hígado de los animales tratados y los controles.

Las ratas portadoras de tumores que no recibieron HCB (lote NMU) mostraron valores normales de actividad de PCL tanto en la primera como en la segunda etapa.

Analizando la primera etapa de actividad de PCL, a pesar de que no se obtuvieron diferencias significativas cuando se compararon las medianas de HCB y NMU+HCB con sus controles respectivos, es interesante señalar que en los experimentos individuales ambos lotes de animales mostraron valores para la primera etapa de PCL menores que sus controles.

Por otro lado, un decremento significativo ($p<0,05$) en la segunda etapa de PCL fue observado en el lote NMU+HCB cuando se comparó con el control (NMU). Si bien la segunda etapa de decarboxilación se vió disminuída en el lote HCB, esta disminución no fue estadísticamente significativa. El decremento producido por HCB en la segunda etapa de PCL fue de un 83% para los animales portadores de tumores y de sólo un 66% para los animales no portadores

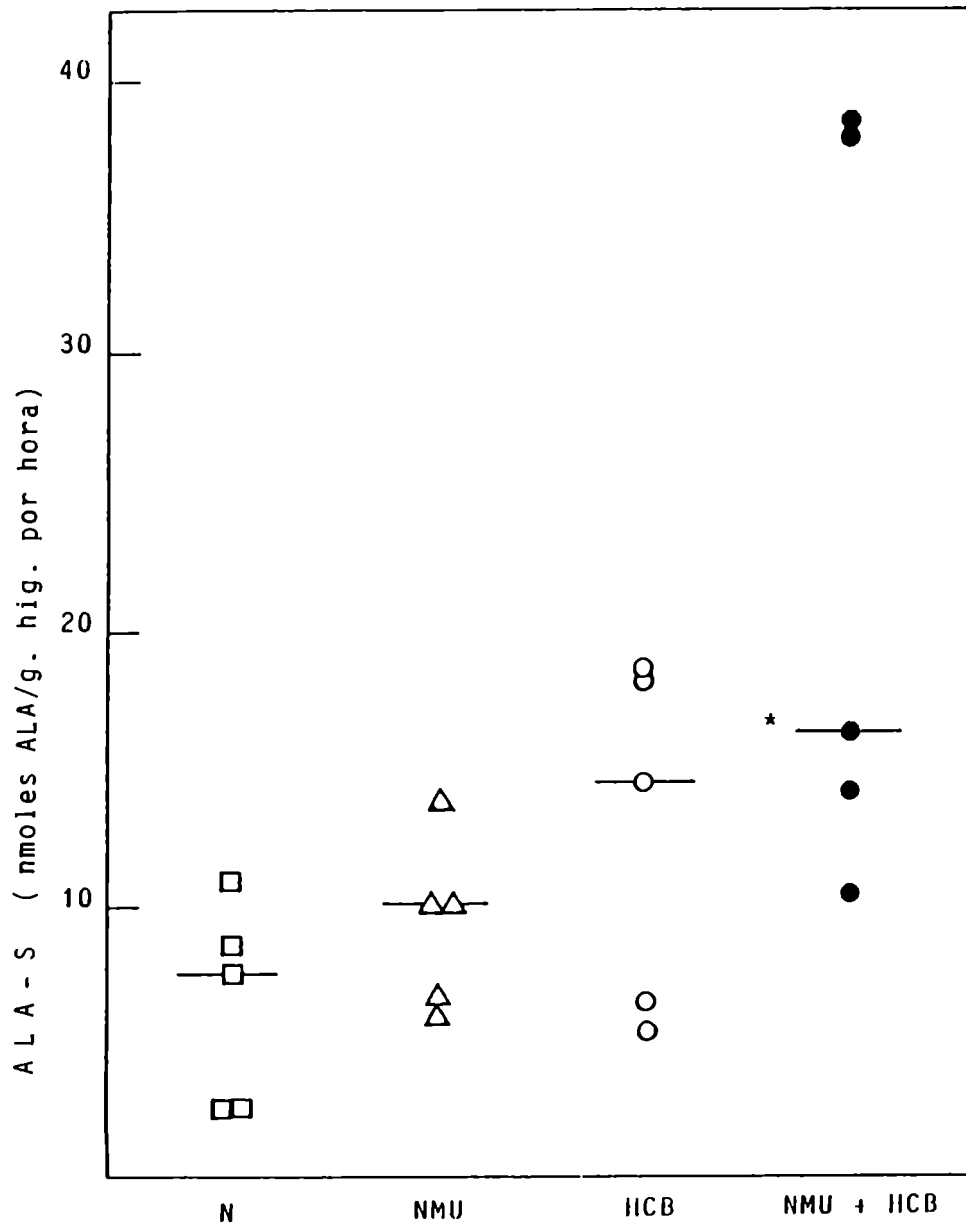


Figura 35: Actividad de ALA-sintasa hepática. Cada punto representa el valor correspondiente a un animal individual de cada lote. Para cada grupo la mediana se representa por (----). * $p < 0,01$: estadísticamente significativo respecto al lote NMU.

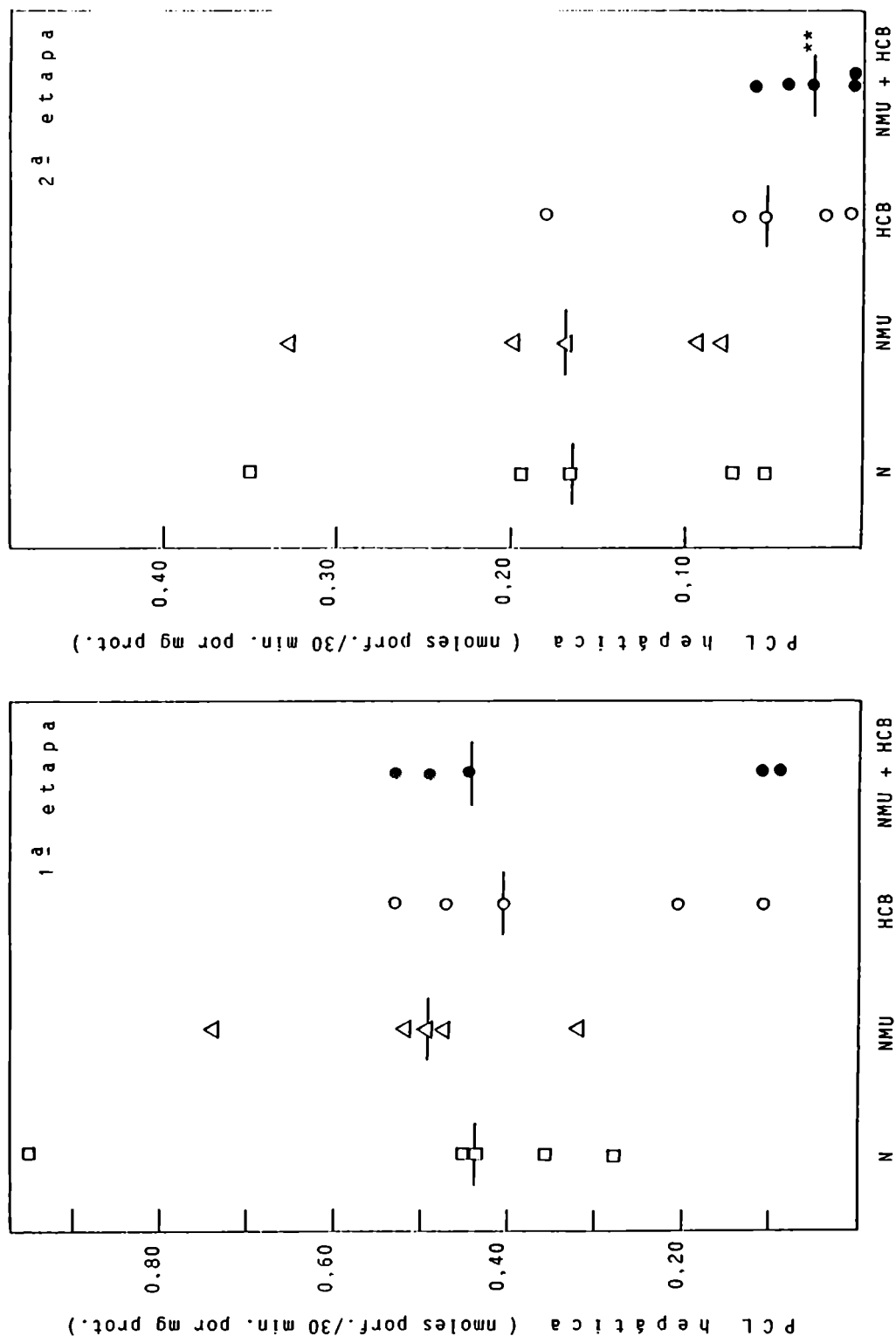


Figura 36: Actividad de PCL hepática (Primera y Segunda etapa). Cada punto representa el valor correspondiente a un animal individual de cada grupo. Para cada grupo la mediana se representa por (----). ** $p < 0,05$; estadísticamente significativo respecto al lote NMU.

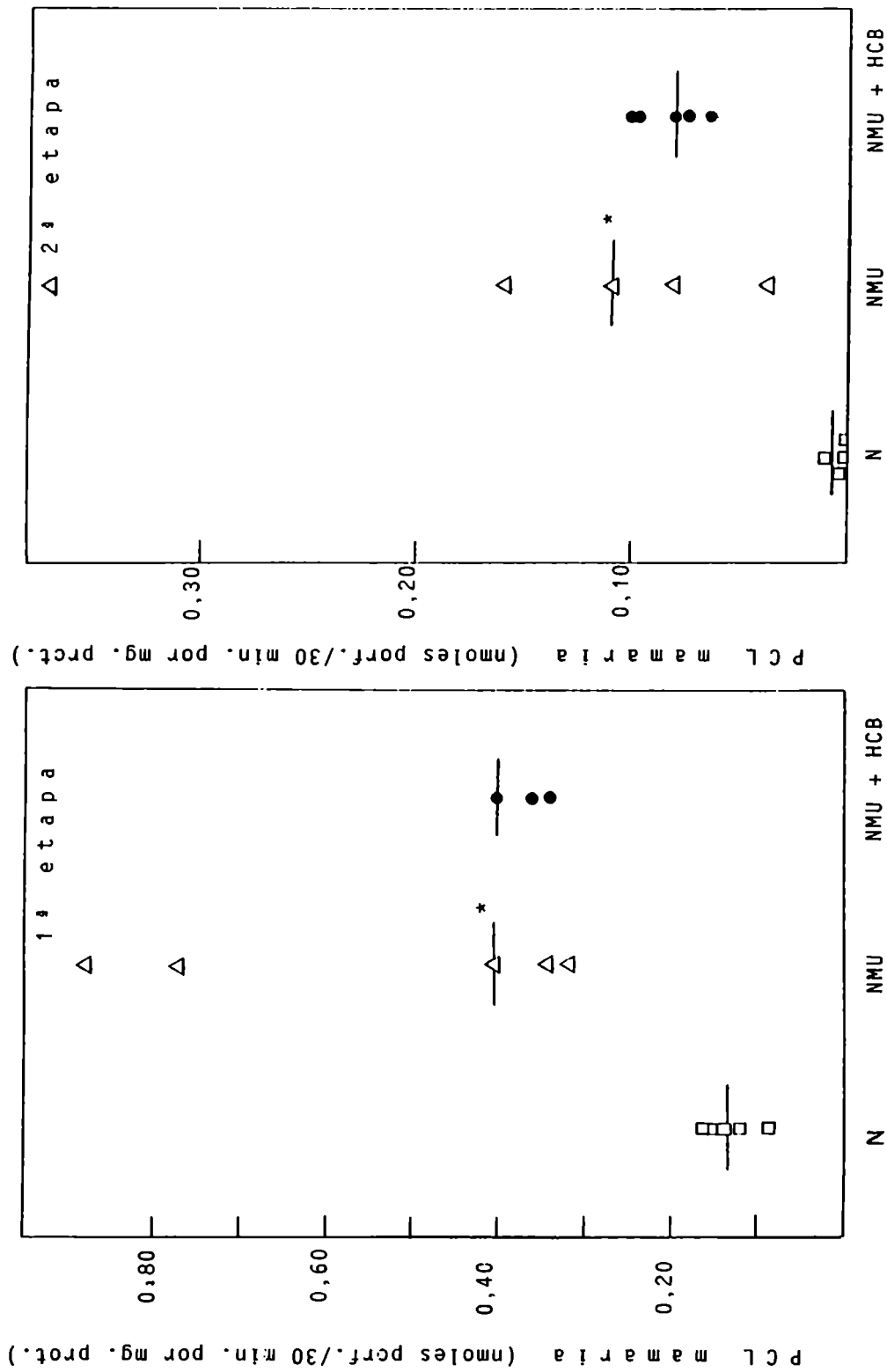


Figura 38: Efecto del HCB sobre la actividad de PCL tumoral (Primera y segunda etapa). Cada punto representa el valor correspondiente a un animal individual de cada grupo de animales. N representa glándula mamaria normal. Para cada grupo la mediana se representa por (---). * $p < 0,01$: estadísticamente significativo respecto a su control

I-8. Discusión

En el presente trabajo se determinó que el camino metabólico del hemo es funcional en la glándula mamaria normal, con actividades enzimáticas de ALA-sintasa y PCL y niveles de porfirinas menores que los obtenidos en hígado.

En los tumores mamarios inducidos por NMU, se observó que ALA-sintasa es baja y no inducible por HCB. Esta última observación está de acuerdo con los resultados de Bonkowsky y col. (236) y los de Matsuoka (237), quienes reportaron para ratas portadoras de otros tipos de tumores, un nivel bajo de la enzima regulatoria en tumores la cual es refractaria a la inducción por AIA y DDC, drogas de reconocida capacidad porfirinogénica.

La PCL tumoral exhibió una buena actividad decarboxilante, similar a la observada en tejido hepático normal. A este respecto, es interesante mencionar los resultados reportados por Navone y col. (306) quienes observaron que en tumores mamarios humanos mantenidos en cultivo, la biosíntesis de porfirinas a partir de ALA, es decir después del paso limitante de ALA-sintasa, es funcional y más activa que en el tejido normal. Asimismo, este mismo grupo de investigación informó que en tumor mamario espontáneo de ratón la actividad de ALA-dehidrasa fue mayor que la hepática mientras que las actividades de PBG-deaminasa y PCL fueron del mismo orden que la observada en el hígado (307, 308).

La mayor actividad de PCL tumoral respecto a la glándula normal descrita en el presente trabajo estaría de acuerdo con la mayor relación copro- versus uroporfirina observada en tumores humanos (306), relación que implica un proceso eficiente de decarboxilación.

A pesar que el nivel de porfirinas es numéricamente mayor en tumor que en el tejido normal, no pudo observarse en estos extractos la fluorescencia característica de las porfirinas. Esta ausencia de fluorescencia en el tejido tumoral indicaría que no hay una definida acumulación de porfirinas. Esto estaría de acuerdo con el trabajo de Matsuoka (237) quien encontró que después de la administración de DDC a ratas portadoras del hepatoma Morris 7793, los tumores a diferencia del hígado no acumularon protoporfirina a pesar de tener una concentración de la droga suficiente para producir porfiria experimental. De acuerdo con los resultados de Matsuoka (237) y con los nuestros, están los de Zawirska (309) quien estableció que a mayor evidencia de atipia se observa menor contenido de porfirinas.

En nuestro trabajo los animales portadores de tumores mamarios mostraron una respuesta al HCB más rápida y mayor que aquellos sin tumor, teniendo en cuenta la excreción urinaria de porfirinas y precursores, la acumulación en el hígado de porfirinas y las actividades hepáticas de ALA-sintasa y PCL, pero no se encontró correlación entre el tamaño o el número de tumores y la severidad de la porfiria. Considerando la gran reactividad de NMU, que *in vivo* no es detectable en sangre después de 15 minutos (301) y que la administración de HCB se realizó 7 a 10 días después de la última dosis de NMU, podemos descartar un efecto de NMU sobre los disturbios producidos por HCB en el hígado. Así nuestros resultados indicarían que la presencia de los tumores mamarios podría ejercer un efecto sinérgico sobre la porfiria producida por HCB en este tipo de mamíferos. A este respecto, es interesante mencionar que tumores mamarios metastásicos humanos (310) producen un incremento en la PBG-deaminasa en células mononucleares de sangre periférica.

Se ha reportado que el HCB se acumula en tejido mamario (311, 312) y que el citocromo P450 está disminuido en tumores mamarios (313). Así el HCB podría llegar al tumor pero no podría ser metabolizado. En realidad, se ha postulado que esa metabolización en la cual está involucrado el citocromo P450, es necesaria para que el HCB ejerza su efecto porfirinogénico (201). Esto podría explicar la falta de respuesta del tejido tumoral al tratamiento con HCB.

En ratas, el 17- β -estradiol exacerba la excreción de porfirinas (314,315) y el efecto del HCB sobre enzimas claves del camino metabólico del hemo en el hígado (316). Asimismo hay varios reportes que indican que los estrógenos exacerban diferentes tipos de porfiria en humanos (317, 318). Sin embargo, los niveles séricos de estradiol y progesterona no se vieron aumentados en ratas portadoras de tumores mamarios inducidos por NMU (319) así como tampoco se modificó el ciclo del animal. Así el efecto sinérgico del tumor sobre la porfiria producida por HCB no parecería ser atribuible a un efecto a nivel de estrógenos en este modelo experimental.

Hay reportes (320) que indican altas concentraciones de ferritina sérica en mujeres con cáncer de mama. Ferritina es la principal proteína de reserva celular para el hierro y la ferritina sérica refleja los niveles encontrados en el interior de las células. Un nivel de ferritina sérico aumentado está relacionado con un incremento en la reserva corporal de hierro. Se piensa que el hierro juega un papel en la porfiria humana y experimental (321-323). Una sobrecarga de hierro puede exacerbar la porfiria experimental producida por HCB (324-326) y la

administración de desferrioxamina, como un quelante del hierro, retarda y disminuye la producción de porfiria por HCB (211). Una hipótesis para explicar la relación entre el hierro y la porfiria inducida por HCB es que la interacción del fungicida con el sistema metabolizante de drogas dependiente del citocromo P450 aumentaría la producción de radicales libres de oxígeno. Estas especies reactivas de oxígeno reaccionarían con el hierro produciendo un proceso oxidativo crónico y convirtiendo un sustrato hepático en un inhibidor de la PCL (327). El inhibidor de PCL podría formarse por modificación de los sustratos endógenos de la PCL ya que los porfirinógenos recolectarían radicales libres promoviendo su propia oxidación (328). Así, si el hierro está incrementado en las ratas portadoras de tumores mamarios, este metal podría ser el responsable del mayor disturbio provocado por HCB en el hígado debido a la presencia del tumor.

CAPITULO II

INFLUENCIA DE TUMORES HEPATICOS EN EL CAMINO METABOLICO DEL HEMO Y EN LA INDUCCION DE PORFIRIA - COMPARACION ENTRE MACHOS Y HEMBRAS

El presente estudio se llevó a cabo con el objetivo de explorar: a) el efecto de la presencia de tumores hepáticos sobre el camino metabólico del hemo, b) si estos tumores eran capaces de modificar la respuesta de los animales a la droga porfirinogénica HCB y c) si los efectos antes mencionados ocurrían en distinta extensión en hembras que en machos.

Para inducir los tumores hepáticos se utilizó dietilnitrosamina (DENA, N,N'-dietilnitrosamina). DENA es carcinogénico en todas las especies animales ensayadas: ratón, rata, hamster, conejo, perro, cerdo, mono, ave y sapo. Induce tumores benignos y malignos dependiendo de la vía de administración y los principales órganos blanco de su acción son el hígado, los tractos respiratorio y digestivo y el riñón. Asimismo es carcinogénico luego de la administración prenatal y en dosis únicas (329). En ratas, DENA induce en la mayoría de los casos tumores hepatocelulares siendo las ratas hembras jóvenes las más susceptibles (330).

Distintas concentraciones de DENA han sido halladas en el humo de cigarrillo (8,3 ng/cigarrillo), en aguas utilizadas para la bebida (0,01 µg/l) y en distintos alimentos. En sangre humana se encontró una concentración de 0,09 µg/l. Este nivel aumentó a 0,46 µg/l luego de la comida. Aunque no se han hecho estudios epidemiológicos se considera que la población en general está expuesta a bajos niveles de DENA (329).

Los animales utilizados en el presente trabajo fueron ratas hembras y machos de la cepa BDVI. La utilización de esta cepa de ratas estuvo determinada por la inducción de los tumores hepáticos ya que esta inducción fue realizada por el Dr. J.R.P. Cabral de la IARC, Francia. Considerando que no todas las cepas de ratas responden en igual medida a la inducción de porfiria por HCB (207, 208) y que la cepa BDVI no había sido utilizada anteriormente en experimentos de inducción de porfiria, el primer paso fue determinar la susceptibilidad de esta cepa a la porfirinogenicidad del HCB. Una vez establecido esto, 54 ratas machos y 54 ratas hembras fueron divididas en cuatro grupos: a) normal, b) tratadas con DENA, c) tratadas con HCB y d) tratadas con DENA y HCB. En todos los animales se midió la excreción urinaria de precursores y porfirinas, el contenido de porfirinas y hierro y las actividades, en hígado y tumor, de ALA-sintasa, PBG-deaminasa y PCL. Asimismo se determinó el contenido hepático de citocromo P450 y la actividad de ferroquelatasa hepática en los cuatro lotes de animales.

Teniendo en cuenta los antecedentes que indican que pacientes con enfermedades linfoproliferativas activas y con cirrosis no alcohólica de hígado

presentan una actividad elevada de PBG-deaminasa en eritrocitos (331), en los animales normales y tratados con DENA también se estudió la actividad de esta enzima en sangre.

Los detalles del tratamiento de los animales y las determinaciones se describen en Métodos.

II-1. Susceptibilidad de la cepa BDVI a la inducción de porfiria por HCB

Para estudiar la respuesta de esta cepa de ratas a la acción porfirinogénica del HCB, se midió la acumulación de porfirinas hepáticas y las actividades hepáticas de ALA-sintasa y PCL a ratas hembras, luego de 7 semanas de tratamiento con el fungicida.

Como puede verse en la Figura 39, el HCB produce un incremento estadísticamente significativo en el contenido de porfirinas hepáticas, alcanzándose un valor promedio de 45 veces el valor control.

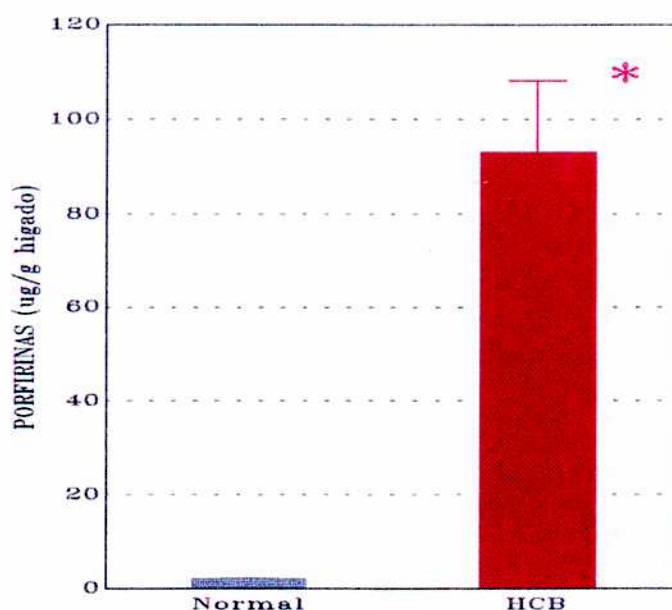


Figura 39: Efecto del tratamiento con HCB a ratas hembras de la cepa BDVI sobre el contenido de porfirinas hepáticas. Cada barra representa el promedio $\pm$ S.E.M. de 6 animales para cada lote.* estadísticamente significativo respecto al lote normal ($p < 0,001$).

Cuando se analizó la actividad de ALA-sintasa (Figura 40), se observó que las ratas tratadas con el fungicida mostraban una actividad significativamente mayor que las ratas control, siendo el incremento de 2 veces.

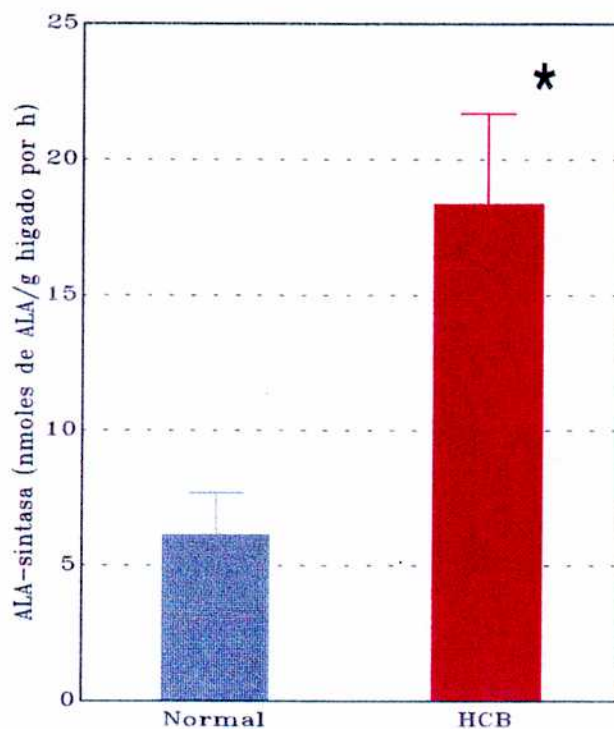


Figura 40: Efecto del tratamiento con HCB sobre la actividad de ALA-sintasa hepática. Cada barra representa el promedio $\pm$ S.E.M. de 6 animales para cada lote. * estadísticamente significativo respecto al lote normal ($p < 0,01$).

Al estudiarse el efecto del HCB sobre la enzima PCL, se vio que la administración del fungicida provocó una inhibición del 61% en la primera etapa de la actividad de esta enzima y una inhibición del 94% en la segunda etapa (Figura 41).

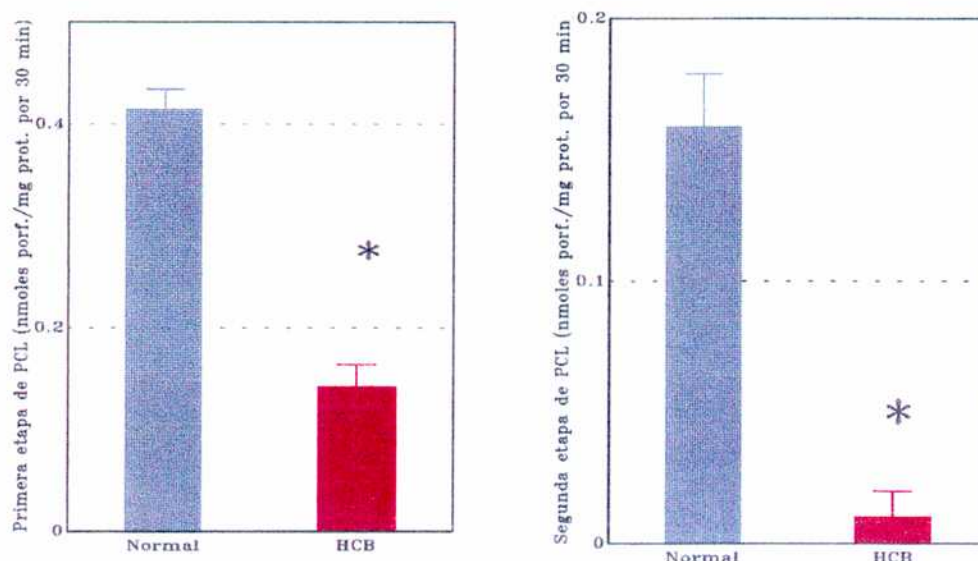


Figura 41: Efecto del tratamiento con HCB sobre la actividad de PCL hepática. Cada barra representa el promedio $\pm$ S.E.M. de 6 animales para cada lote.

* estadísticamente significativo respecto al lote normal ($p < 0,001$).

Estos resultados muestran que las ratas de la cepa BDVI son buenas respondedoras a la intoxicación con HCB. Si se comparan estos datos con los obtenidos por Wainstok de Calmanovici y col. (208) para las cepas Wistar y CHBBTHOM luego de 7 semanas de tratamiento con HCB, se puede ver que la cepa BDVI muestra una respuesta similar a las ratas Wistar y mucho mayor que las CHBBTHOM.

II-2. El camino metabólico del hemo en ratas portadoras de tumores hepáticos. Comparación entre machos y hembras

II-2.1. Actividad de PBG-deaminasa eritrocitaria

Como puede verse en la Figura 42, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la actividad de PBG-deaminasa entre machos y

hembras controles. Veintidos semanas después de la última dosis del carcinógeno, las ratas tratadas con DENA mostraron incrementos estadísticamente significativos en la actividad de PBG-deaminasa. En machos, se observó un incremento del 38% cuando se lo comparó con su control y se alcanzaron valores tan altos como de 102,42 nmoles de uroporfirina /mg de proteína por hora. En hembras, el aumento fue del 24% con respecto al control y se observaron valores de hasta 49,19 nmoles de uroporfirina /mg de proteína por hora. El valor normal más alto fue de 31,32 nmoles de uroporfirina /mg de proteína por hora.

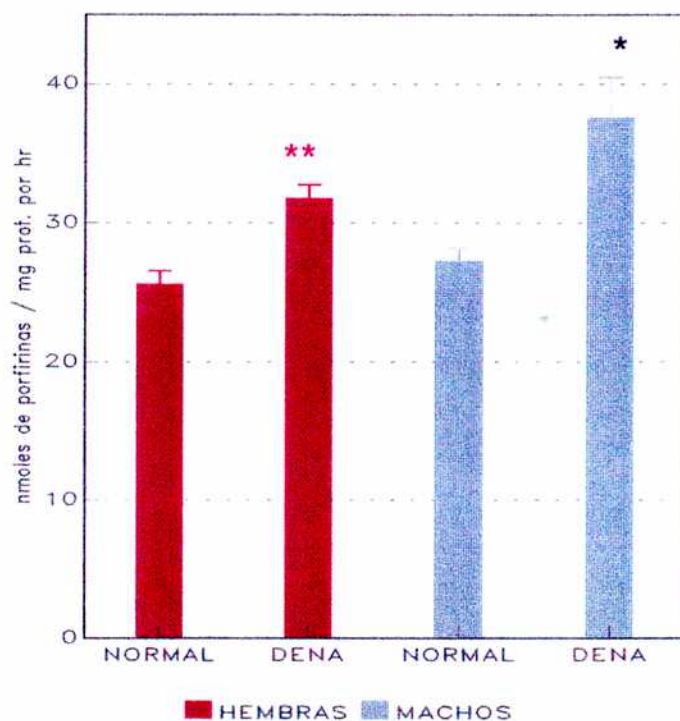


Figura 42: Actividad de PBG-deaminasa eritrocitaria. Cada barra representa el promedio $\pm$ S.E.M. de veinticuatro determinaciones para las ratas tratadas con DENA y quince determinaciones para las normales de cada sexo.

** $p < 0,001$ y * $p < 0,01$: significativamente diferentes del grupo control.

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre las ratas tratadas con DENA y los animales controles, tanto en machos como en hembras, en el peso corporal (valor control en hembras: $198,8 \pm 4,7$ g, valor control en machos: $326,1 \pm 15,1$ g), en el contenido de porfirinas eritrocitario (valor control en hembras: 25 ± 3 nmoles de porfirinas / 100 ml de eritrocitos, valor control en machos: 28 ± 3 nmoles de porfirinas / 100 ml de eritrocitos) o en el hematocrito (valor control en hembras: 46%, valor control en machos: 49%).

Cuando los animales fueron sacrificados, se examinaron los hígados para ver si se podía establecer alguna correlación entre la alta actividad de PBG-deaminasa en sangre y el desarrollo tumoral. Se observó que muchas de las ratas que presentaron un valor elevado en la actividad enzimática no habían desarrollado tumores hepáticos.

II-2.2. Histopatología de los tumores

Las ratas hembras fueron más susceptibles que los machos a la carcinogenicidad de DENA juzgándolo por el número de ratas que desarrollaron tumores visibles. La incidencia de tumores hepáticos fue del 50% para las hembras y del 30% para los machos. Los análisis histopatológicos revelaron que los tumores eran en todos los casos hepatocarcinomas. Considerando los animales que desarrollaron tumores, no hubo diferencias en el tamaño del tumor o en el número de tumores por rata entre las ratas machos y las hembras o entre los grupos DENA y DENA/HCB. El diámetro de los tumores varió de 2 mm a 3 cm y casi todos los animales tuvieron un tumor mayor que 0,5 cm mas varios nódulos (Figura 43) . No hubo evidencias de desarrollos tumorales espontáneos en los animales control. Los hígados del grupo HCB mostraron su estructura conservada.

Como no todos los animales tratados con el carcinógeno desarrollaron una masa tumoral bien definida, los grupos DENA y DENA/HCB fueron subdivididos en dos subgrupos: aquellos con un tumor bien definido (DENA-LT y DENA/HCB-LT) y aquellos sin ningún tumor visible (DENA-L y DENA/HCB-L).

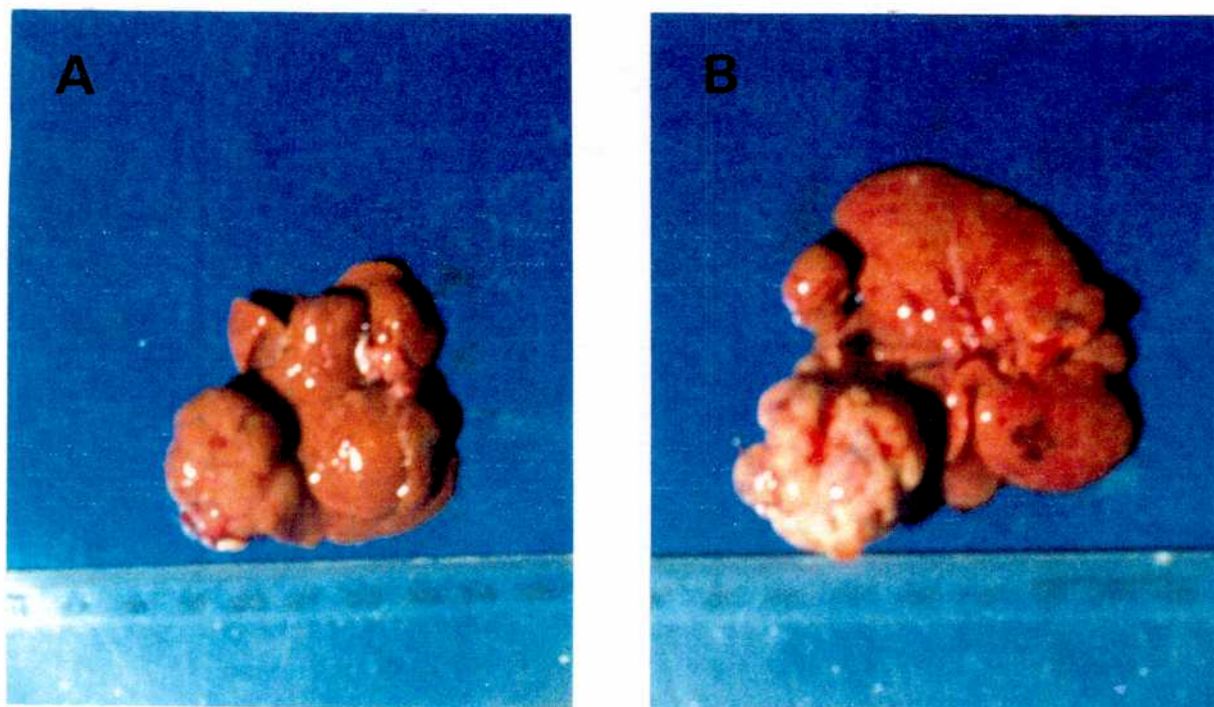


Figura 43: Hígados provenientes de ratas a) hembra y b) macho mostrando tumores hepáticos inducidos por DENA.

II-2.3. Excreción urinaria de ALA, PBG y porfirinas

Las ratas hembras tratadas con DENA y las normales no mostraron diferencias estadísticamente significativas para la excreción de ALA (Figura 44a), PBG (Figura 44b) y porfirinas (Figura 44c). Cuando se estudió la excreción urinaria de las ratas hembras de los grupos HCB y DENA/HCB, se observó un aumento significativo en el contenido de ALA, PBG y porfirinas (Figura 44a,b y c), no encontrándose diferencias en la excreción de ALA y PBG entre ambos grupos. Después de la cuarta semana de tratamiento con HCB, el lote de ratas hembras DENA/HCB mostró una tendencia a excretar menos porfirinas que el grupo HCB. Así, las ratas del grupo DENA/HCB alcanzaron un "plateau" después de la cuarta semana mientras que las ratas del lote HCB continuaron incrementando el nivel de excreción de porfirinas.

Las ratas machos de todos los lotes mostraron niveles normales de ALA, PBG y porfirinas durante todo el experimento (Figura 45 a, b y c).

II-2.4. Acumulación de porfirinas

En la Tabla III puede verse el contenido de porfirinas en hígado y tumor.

Las ratas hembras del grupo DENA mostraron niveles normales de porfirinas tanto en hígado como en tumor mientras que los hígados de los grupos HCB, DENA/HCB-L y DENA/HCB-LT mostraron incrementos significativos en el contenido de porfirinas (4875%, 5605% y 6625% respectivamente).

En los machos, todos los grupos mostraron niveles normales de porfirinas excepto por el grupo DENA/HCB-LT que mostró un valor significativamente mayor.

Debe destacarse que tanto en machos como en hembras, los tumores de las ratas DENA/HCB no acumularon porfirinas y que los hígados DENA/HCB-LT mostraron un contenido de porfirinas mayor que los hígados de las ratas tratadas sólo con HCB.

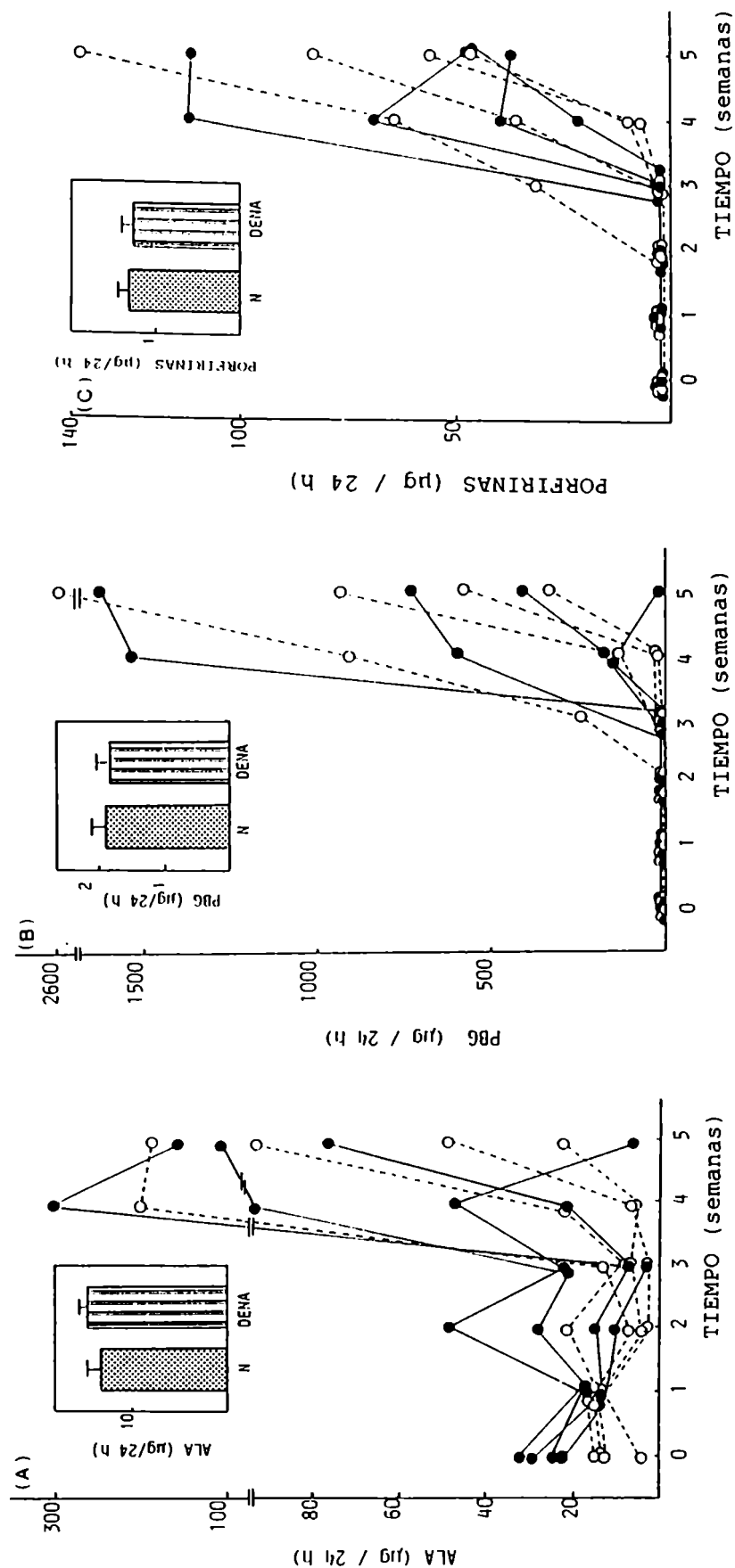


Figura 44: Excreción urinaria de ALA (a), PBG (b) y porfirinas (c) en ratas hembras normales y tratadas. La semana 0 representa el comienzo del tratamiento con HCB. Cada punto representa la excreción urinaria de ratas individuales y representativas de los grupos HCB (O) y DENA/HCB (●). El inserto muestra la excreción urinaria de ratas normales y tratadas con DENA. Cada barra representa el promedio de por lo menos nueve animales $\pm$ S.E.M.

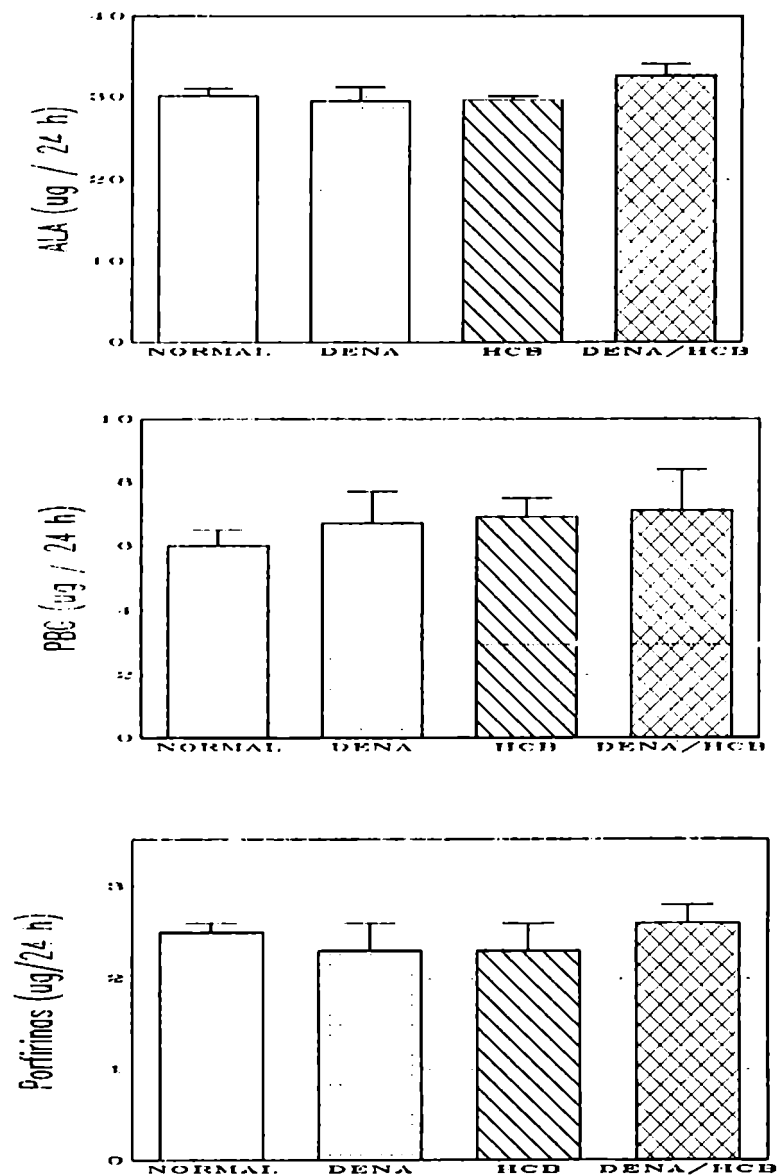


Figura 45: Excreción urinaria de ALA (a), PBG (b) y porfirinas (c) en ratas machos normales y tratadas. Cada barra representa el promedio $\pm$ S.E.M. de las excreciones de ALA, PBG y porfirinas de 6 a 9 animales, dos días antes del sacrificio.

Tabla III: Contenido hepático y tumoral de porfirinas

	Porfirinas (µg/g hígado)	
	Hembras	Machos
Normal	2.08 ± 0.20 (12)	1.39 ± 0.18 (7)
HCB	103.48 ± 13.74*(11)	2.69 ± 0.62 (6)
DENA-L	1.56 ± 0.18 (7)	1.63 ± 0.11 (9)
DENA/HCB-L	118.67 ± 25.97*(7)	2.68 ± 0.47 (11)
DENA-LT	2.06 ± 0.26 (9)	1.41 ± 0.08 (4)
DENA/HCB-LT	139.89 ± 21.48*(7)	4.75 ± 1.45**(5)
DENA-Tumor	2.04 ± 0.23 (4)	0.88 ± 0.07 (3)
DENA/HCB-Tumor	2.47 ± 0.67 (4)	1.20 ± 0.18 (5)

Los resultados se expresan como promedios ± S.E.M. del número de ratas indicadas entre paréntesis. L: representa hígados sin una masa tumoral bien definida y LT: hígados con una masa tumoral bien definida.

* p<0.001 y ** p<0.05 con respecto a los animales normales

II-2.5. Actividad de ALA-sintasa

La actividad hepática de ALA-sintasa (Figura 46) se incrementó significativamente en los tres grupos de ratas hembras tratadas con HCB (HCB, DENA/HCB-L y DENA/HCB-LT) mientras que en los animales tratados sólo con DENA la actividad de esta enzima no difirió significativamente de las ratas normales. Los tumores hepáticos de las ratas DENA/HCB no mostraron inducción en la actividad de ALA-sintasa.

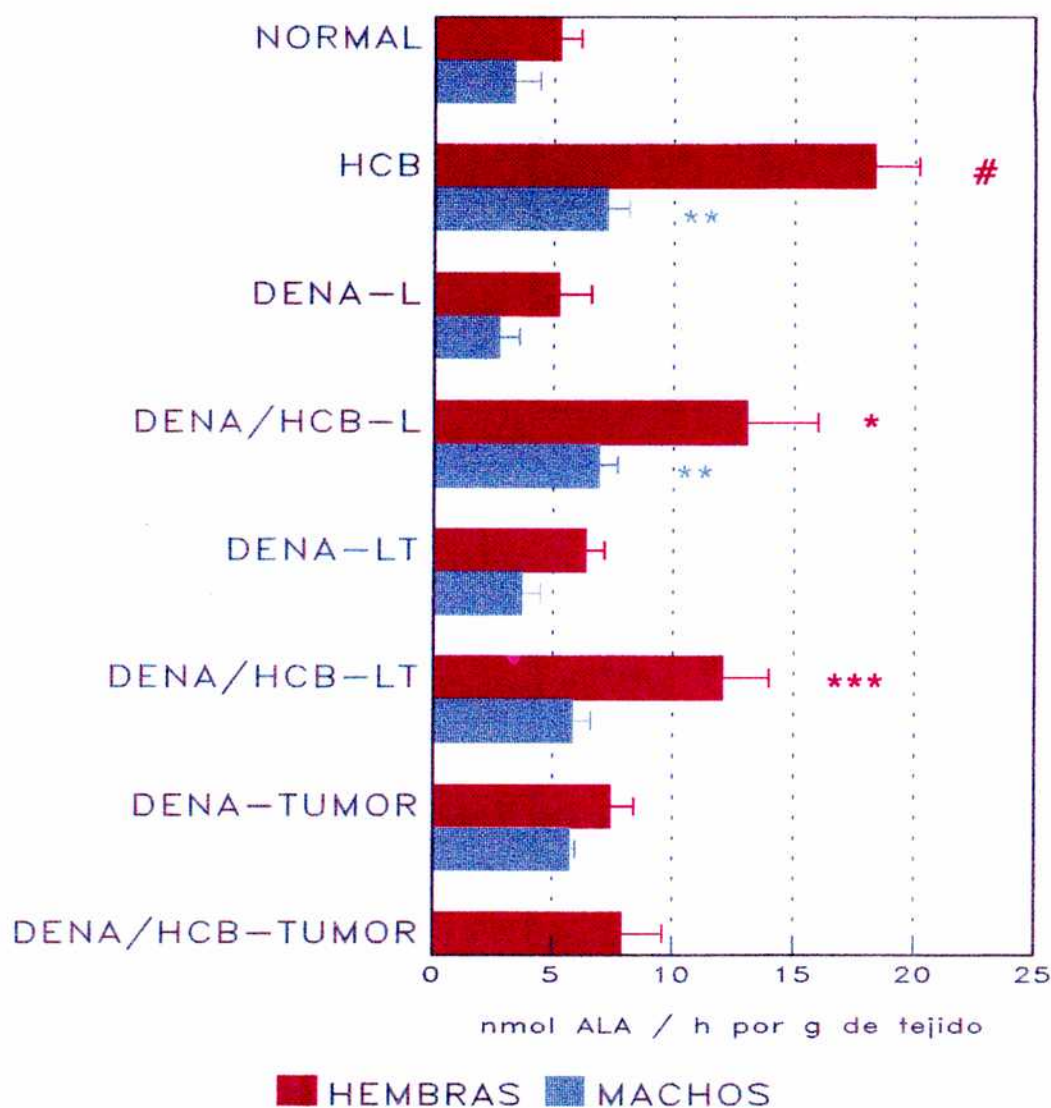


Figura 46: Actividad hepática y tumoral de ALA-sintasa en ratas normales y tratadas de ambos sexos. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de 6 a 9 ratas. L: representa hígados sin una masa tumoral bien definida y LT: representa aquellos hígados que presentaron una masa tumoral bien definida. Los "p" fueron calculados respecto a los animales normales. # $p < 0,001$; *** $p < 0,01$; ** $p < 0,02$ y * $p < 0,05$.

En las ratas machos, la actividad de ALA-sintasa fue significativamente inducida en los grupos HCB y DENA/HCB-L.

II-2.6. Actividad de PBG-deaminasa

La actividad hepática de PBG-deaminasa permaneció esencialmente inalterada en los grupos que recibieron solo DENA tanto en machos como en hembras (Figura 47).

Las ratas hembras del grupo DENA/HCB mostraron una inducción menor de PBG-deaminasa que las ratas del grupo HCB. En cambio las ratas machos de los grupos DENA/HCB y HCB mostraron niveles normales en la actividad de esta enzima. En los tumores, la actividad de PBG-deaminasa no se indujo por el tratamiento con HCB.

II-2.7. Actividad de PCL

En las hembras, el tratamiento con HCB promovió decrementos del 67% en la primera etapa de la actividad de PCL (Figura 48, Tabla IV) y del 94% en la segunda etapa (Figura 49, Tabla IV) en los grupos HCB y DENA/HCB-L.

El grupo DENA/HCB-LT mostró una inhibición en la actividad hepática de PCL similar al grupo HCB pero los tumores mostraron una inhibición menor (Figuras 48 y 49, Tabla IV).

Los tres grupos de ratas machos tratados con HCB se vieron menos afectados por el fungicida que las ratas hembras. Así, inhibiciones del 14% para la primera etapa de la actividad de PCL hepática y del 47% para la segunda etapa fueron obtenidas en el grupo HCB. Los grupos DENA/HCB-L y DENA/HCB-LT mostraron inhibiciones similares. Los tumores hepáticos fueron afectados por el HCB en forma similar a sus correspondientes hígados (Figuras 48 y 49, Tabla IV).

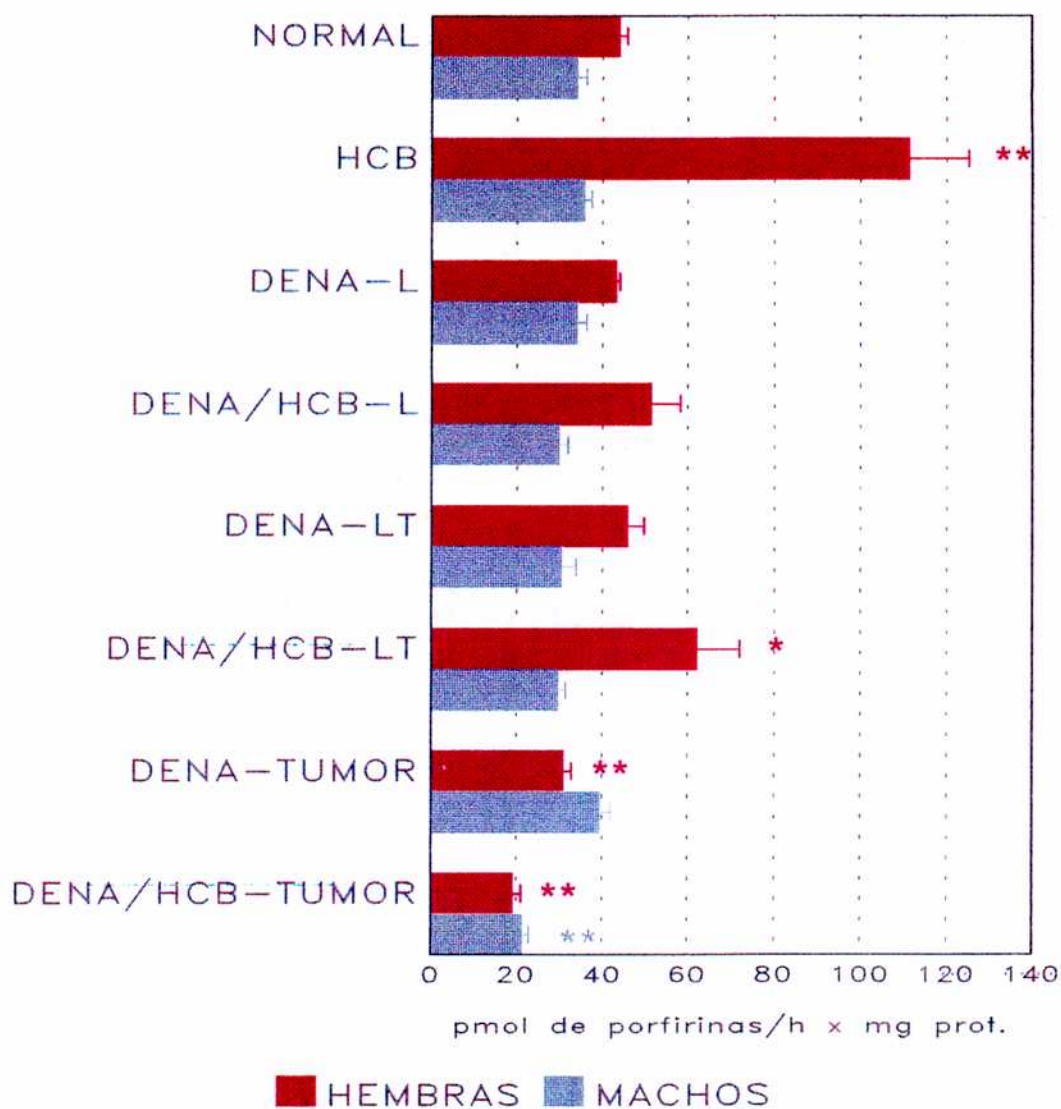


Figura 47: Actividad hepática y tumoral de PBG-deaminasa en ratas normales y tratadas de ambos sexos. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de 6 a 9 ratas. L: representa hígados sin una masa tumoral bien definida y LT: representa aquellos hígados que presentaron una masa tumoral bien definida. Los "p" fueron calculados respecto a los animales normales. ** $p < 0,001$ y * $p < 0,05$.

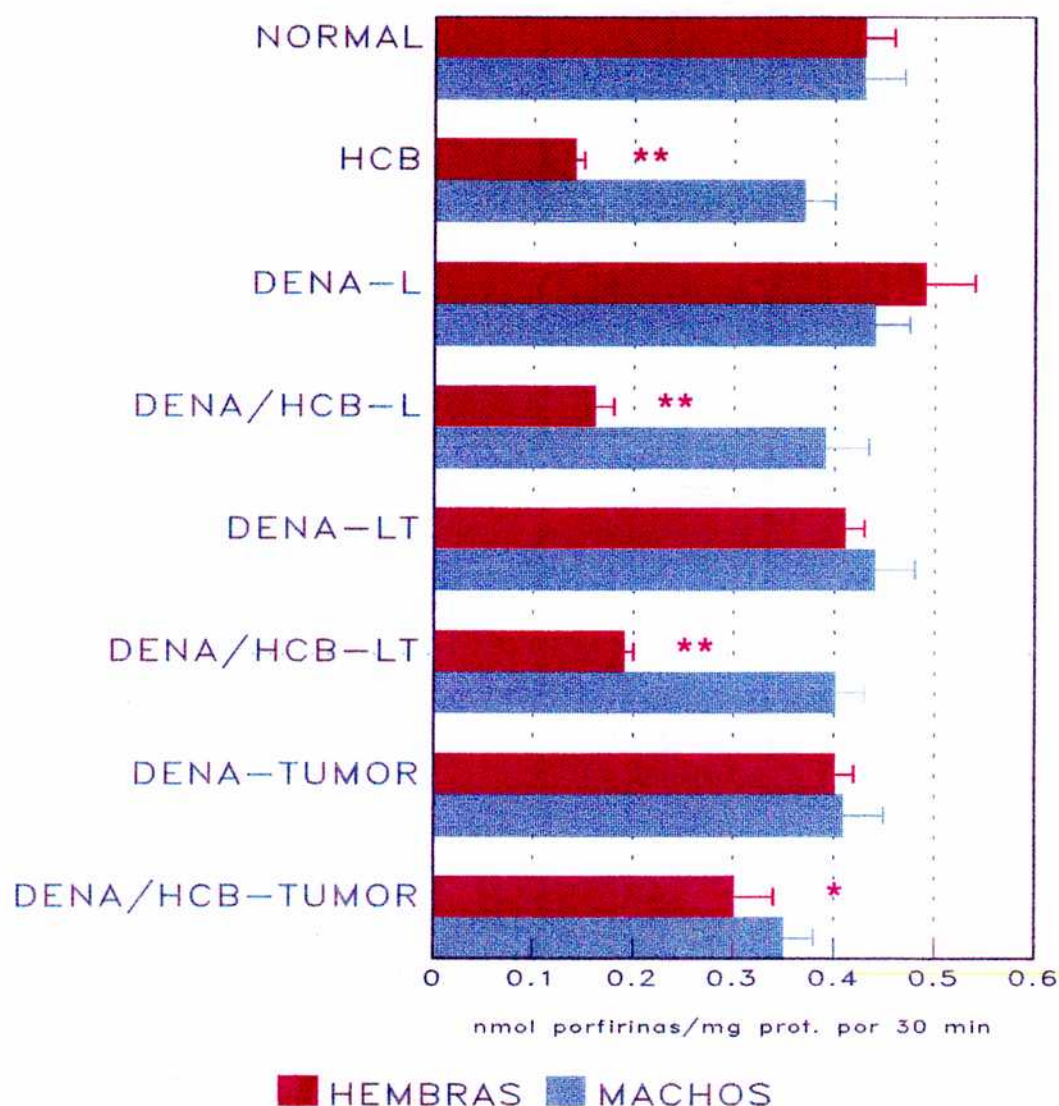


Figura 48: Primera etapa en la actividad hepática y tumoral de PCL en ratas normales y tratadas de ambos sexos. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de 6 a 9 ratas. L: representa hígados sin una masa tumoral bien definida y LT: representa aquellos hígados que presentaron una masa tumoral bien definida. Los "p" fueron calculados respecto a los animales normales. ** $p < 0,001$ y * $p < 0,02$.

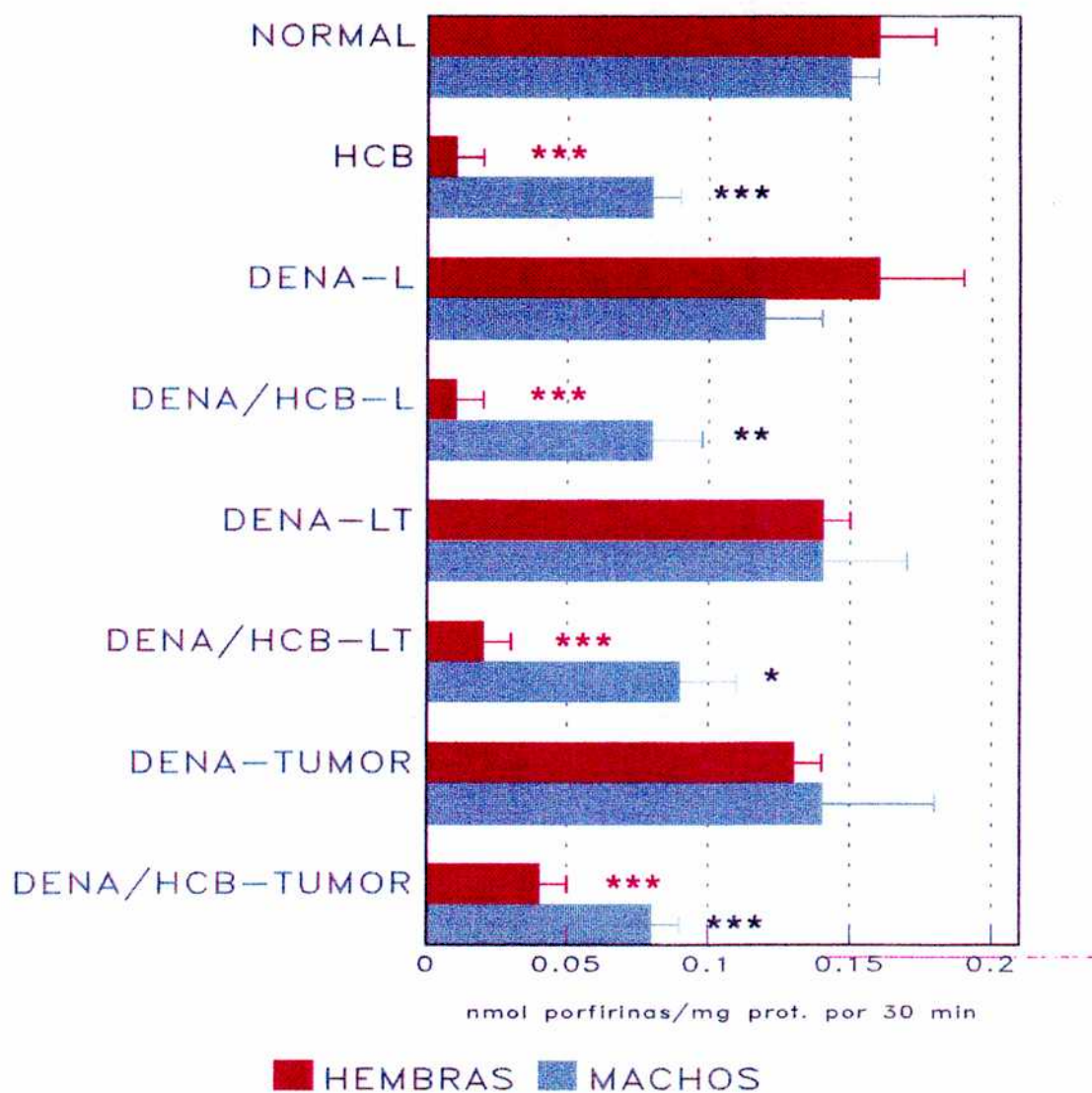


Figura 49: Segunda etapa en la actividad hepática y tumoral de PCL.

Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de 6 a 9 ratas. L: representa hígados sin una masa tumoral bien definida y LT: representa aquellos hígados que presentaron una masa tumoral bien definida. Los "p" fueron calculados respecto a los animales normales. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$.

Tabla IV: Inhibición de la actividad de PCL

SEXO	GRUPO	PORCIENTO DE INHIBICION	
		Primera etapa	Segunda etapa
HEMBRAS	HCB	67 (a)	94 (a)
	DENA/HCB-L	67 (b)	94 (b)
	DENA/HCB-LT	54 (c)	86 (c)
	DENA/HCB-TUMOR	25 (d)	69 (d)
MACHOS	HCB	14 (a)	47 (a)
	DENA/HCB-L	11 (b)	33 (b)
	DENA/HCB-LT	9 (c)	36 (c)
	DENA/HCB-TUMOR	15 (d)	43 (d)

Los porcentajes de inhibición fueron calculados respecto a: (a) normal, (b) DENA-L, (c) DENA-LT y (d) DENA-TUMOR considerando los datos de las Figuras 48 y 49.

II-2.8. Actividad de ferroquelatasa

La actividad de ferroquelatasa hepática puede verse en la Figura 50. Esta fue la única enzima, de todas la estudiadas, para la cual el grupo DENA-LT mostró una actividad menor que la normal tanto en hembras como en machos.

Cuando se analizaron los resultados obtenidos en los distintos grupos se observó que el tratamiento con HCB no modificó la actividad de esta enzima, salvo en el grupo DENA/HCB-LT, en el cual la actividad aumentó cuando se lo comparó con su control DENA-LT.

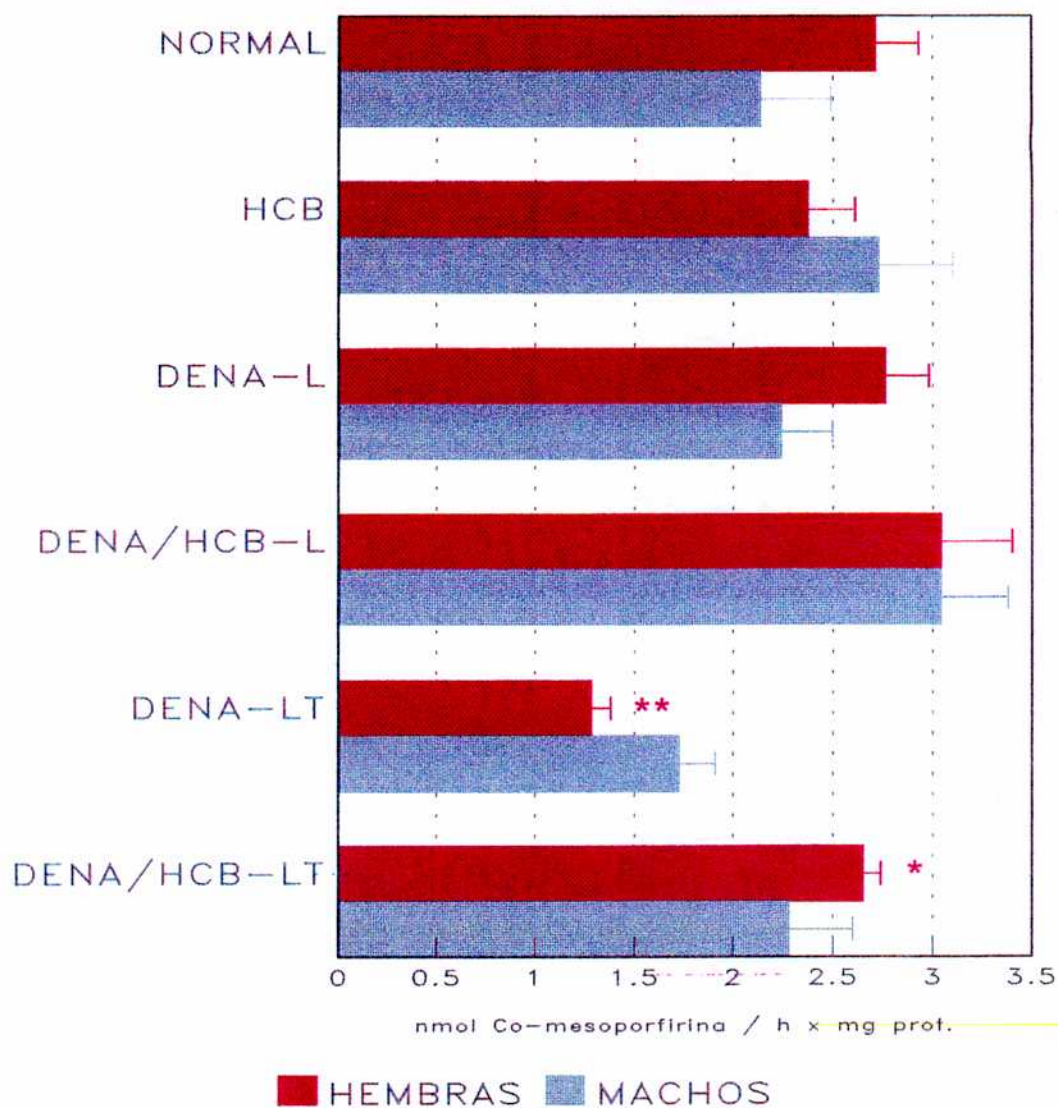


Figura 50: Actividad hepática de ferroquelatasa en ratas normales y tratadas de ambos sexos. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de 6 a 9 ratas. L: representa hígados sin una masa tumoral bien definida y LT: representa aquellos hígados que presentaron una masa tumoral bien definida. ** $p < 0,001$ estadísticamente significativo respecto al lote normal y * $p < 0,02$ estadísticamente significativos respecto al lote DENA-LT.

II-2.9. Contenidos de citocromo P-450 y de hierro

El contenido de citocromo P450 se incrementó un 72% en los machos del grupo HCB pero se mantuvo inalterado en las hembras tratadas con HCB. Las ratas hembras de los grupos DENA/HCB-L y DENA/HCB-LT mostraron un contenido de citocromo P450 mayor que las del grupo HCB pero en los machos ambos grupos mostraron valores similares al grupo HCB (Figura 51).

El contenido de hierro hepático fue menor en los machos normales que en las hembras normales y en los machos se mantuvo inalterado en todos los grupos. A pesar que los hígados de las ratas hembras de los grupos normal, HCB y DENA mostraron un contenido de hierro mayor que los correspondientes a ratas machos, esta diferencia entre ambos sexos no pudo observarse para el hígado y tumor de los grupos DENA/HCB ya que los hígados y los tumores hepáticos de ambos sexos tuvieron un contenido de hierro similar (Figura 52).

II-2.10. Discusión

Hay datos bibliográficos que indican que pacientes con distintas enfermedades linfoproliferativas activas y con cirrosis no alcohólica presentan alta actividad de PBG-deaminasa mientras que pacientes con enfermedades epiteliales y virósicas comunes tienen valores normales de PBG-deaminasa (331). Asimismo, actividades elevadas de PBG-deaminasa han sido encontradas en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con tumores epiteliales con desarrollo metastásico (310) y en eritrocitos de niños con leucemia linfoblástica aguda o con linfoma de Hodgkin (233).

Los resultados obtenidos indican que en las ratas tratadas con DENA puede detectarse una actividad de PBG-deaminasa eritrocitaria anormal. La alta actividad de PBG-deaminasa observada podría deberse a un incremento en el número de precursores eritroides ya que se sabe que la actividad de PBG-deaminasa en eritrocitos se incrementa en presencia de reticulocitosis (332). Otra posibilidad es que el incremento observado sea la consecuencia de la expresión de un clon anormal de célula madre como postulan Epstein y col. (331) para el caso de enfermedades linfoproliferativas. A pesar de que en humanos se determinó una relación entre la actividad de PBG-deaminasa eritrocitaria elevada y varios tipos de enfermedades neoplásicas, los resultados obtenidos en el presente trabajo no

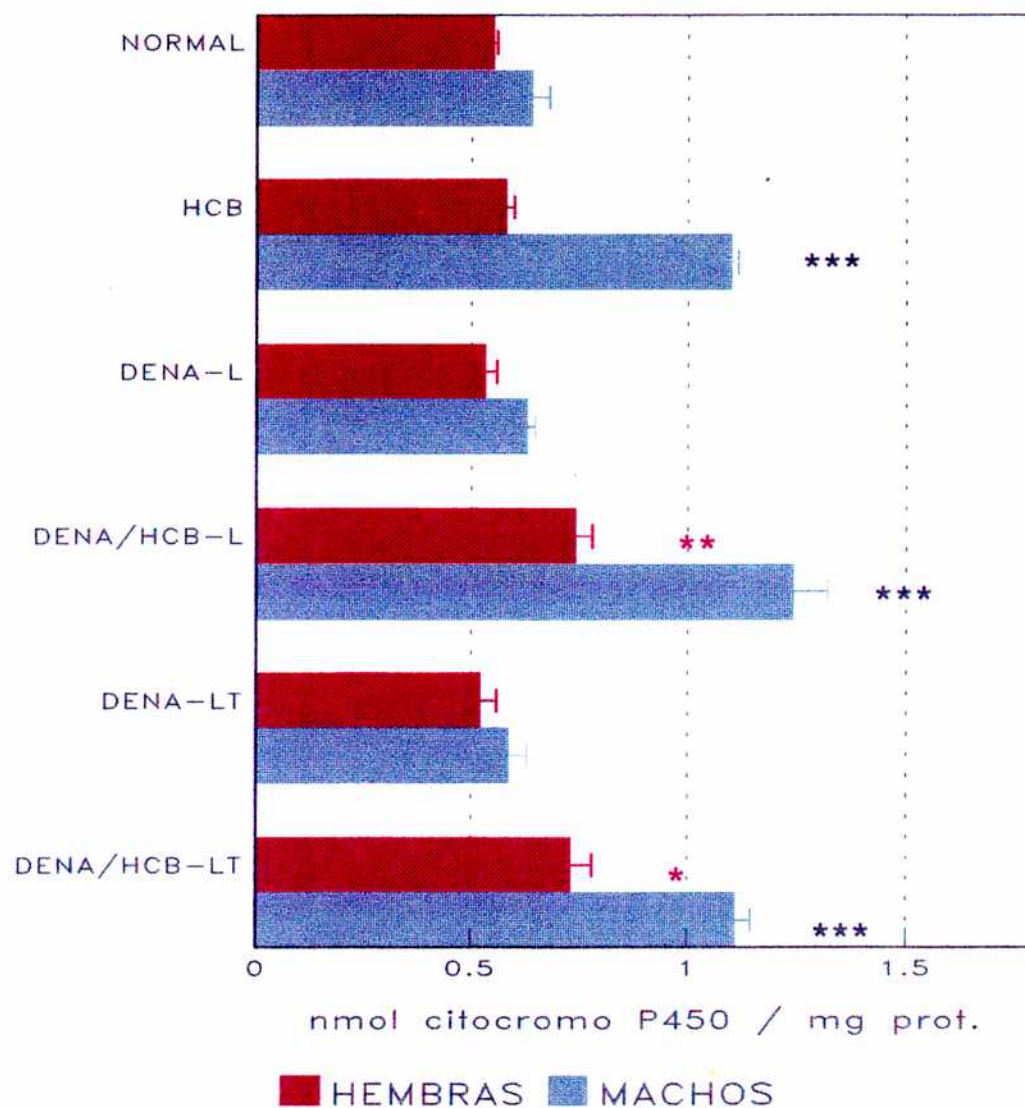


Figura 51: Contenido de citocromo P450 hepático de ratas normales y tratadas de ambos sexos. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de 6 a 9 ratas. L: representa hígados sin una masa tumoral bien definida y LT: representa aquellos hígados que presentaron una masa tumoral bien definida. *** $p<0,001$; ** $p<0,01$ y * $p<0,05$ estadísticamente significativos respecto al lote normal.

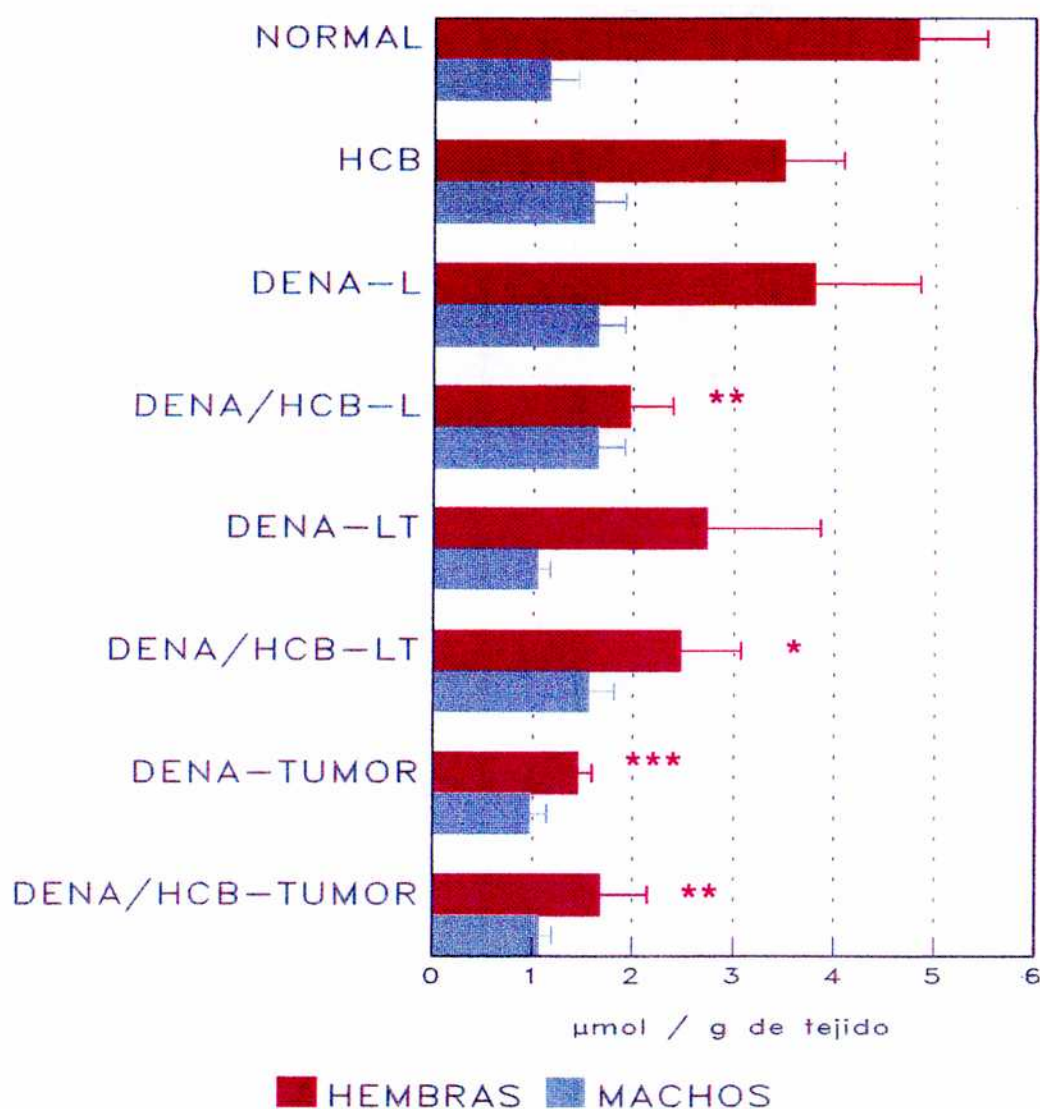


Figura 52: Contenido de hierro hepático y tumoral de ratas normales y tratadas de ambos sexos. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de 6 a 9 ratas. L: representa hígados sin una masa tumoral bien definida y LT: representa aquellos hígados que presentaron una masa tumoral bien definida. *** $p<0,01$; ** $p<0,02$ y * $p<0,05$ estadísticamente significativos respecto al lote normal.

muestran correlación entre la actividad de PBG-deaminasa eritrocitaria y el desarrollo de tumores a pesar del incremento observado en las ratas tratadas con DENA.

En el presente estudio se determinó que, al igual que lo que ocurre en otras cepas de ratas (330, 333), las ratas de la cepa BD VI desarrollan tumores hepatocelulares luego de la administración de DENA. Asimismo, se observaron diferencias entre ambos sexos en la incidencia de tumores luego de la administración de DENA ya que un mayor número de ratas hembras desarrollaron tumores. Similarmente, Reuber y col. (330) reportaron, que luego de la administración de DENA, el desarrollo de carcinomas hepatocelulares fue significativamente mayor en las ratas hembras que en los machos de la misma edad (100% para las ratas hembras y 60% para las ratas machos). Estos autores administraron el carcinógeno a ratas Buffalo durante 26 semanas a partir de la cuarta semana de edad. Por otro lado, Stewart y col. (333) utilizando ratas hembras y machos F344/N de diez semanas de edad a las cuales les administraron DENA en el agua de bebida (10,5 mg/kg) durante 3 semanas observaron que todos los animales de ambos sexos desarrollaron carcinomas hepatocelulares. Las discrepancias entre los resultados aquí presentados y los datos extraídos de literatura podrían deberse a diversos factores como: la diferencia entre cepas de animales y edad de los mismos, tiempo, dosis y vía de administración del carcinógeno.

Las mediciones de excreción de porfirinas, el contenido hepático de porfirinas y la actividad hepática de PCL realizadas en el presente estudio, muestran que las ratas normales hembras son más afectadas por el tratamiento con HCB que los machos. Resultados similares ya fueron reportados por otros autores (238, 333, 334). Como complemento, las actividades de ALA-sintasa y PBG-deaminasa determinadas en este trabajo también muestran la mayor susceptibilidad al HCB de las hembras y, en base a los resultados obtenidos al trabajar con los animales tratados con DENA y HCB, se pudo determinar que al igual que las ratas normales, las ratas hembras portadoras de tumores hepáticos son más susceptibles a la porfirinogenicidad del HCB que las ratas machos.

En el grupo DENA-L tanto las ratas machos como las hembras tuvieron una actividad normal de ferroquelatasa mientras que las ratas del grupo DENA-LT mostraron una actividad disminuida. Por lo tanto, DENA por sí solo no afectó la actividad de esta enzima. Cambios en los ácidos grasos han sido observados en los hígados de ratas tratadas con HCB (218) y ha sido reportado que la actividad de ferroquelatasa puede ser modulada por cambios en la composición de fosfolípidos

en la membrana mitocondrial (335). Así, la recuperación en la actividad de ferroquelatasa observada en las ratas del grupo DENA/HCB-LT podría deberse a cambios en la composición lipídica de la membrana.

Tanto las ratas machos como las hembras del grupo DENA/HCB-LT acumularon más porfirinas que las ratas del grupo HCB. A la vista de nuestros resultados, esto podría explicarse por la menor excreción de porfirinas observadas en las ratas hembras del grupo DENA/HCB cuando se las compara con el lote HCB. En el caso de los machos esto no fue observado porque la excreción de porfirinas en ambos lotes fue muy baja.

En este trabajo, las ratas hembras tratadas con ambas drogas mostraron una menor inducción de ALA-sintasa y PBG-deaminasa que las ratas que solo recibieron HCB. En este sentido otros autores determinaron que ALA-sintasa es menos inducible por drogas porfirinogénicas como AIA y griseofulvina en los hígados de animales portadores de tumores (235, 236) y en los hígados de ratones tratados con p-dimetilamino-azobenceno como modelo de preiniciación de hepatocarcinogénesis (E. Vazquez, E. Gerez, F. Caballero, C. Polo y A. Batlle, comunicación personal) mientras que, como vimos en el capítulo anterior, luego de la administración de HCB, la actividad de ALA-sintasa fue mayor en los hígados de las ratas portadoras de tumores mamarios que en los hígados control. Estos hallazgos sugieren que la diferencia podría ser debida al tipo de tumor y no al tipo de droga porfirinogénica utilizada.

Los presentes resultados indican que la administración de HCB a ratas normales incrementa el contenido de citocromo P450 en las ratas machos pero no en las hembras. Esto está de acuerdo con los resultados de Grant y col. (336). A pesar que el HCB no induce el citocromo P450 cuando es administrado a ratas hembras normales, las ratas hembras del grupo DENA/HCB mostraron un contenido de citocromo P450 mayor que el grupo DENA. Una explicación para esto sería que DENA pudo haber modificado el patrón de isoenzimas del citocromo P450 con respecto a las ratas normales y por lo tanto estas formas podrían ser más fácilmente inducidas por el HCB ya que se sabe que el fungicida induce solo ciertas isoenzimas de esta hemoproteína (337).

En el presente estudio se determinó que el camino metabólico del hemo es funcional en los tumores inducidos por DENA tanto en machos como en hembras, presentando actividades de ALA-sintasa y PCL similares a las de un hígado normal. A este respecto cabe mencionar el trabajo de Stout y Becker (338). Estos autores encuentran que tumores inducidos por DENA en ratones de la cepa C57BL presentan una actividad de ALA-sintasa significativamente menor que los hígados

portadores. Esta diferencia con los resultados aquí observados podría adscribirse al hecho de que en el presente trabajo se trabajó con ratas y es conocido que los ratones de la cepa C57BL muestran un comportamiento en cuanto a la inducción de porfiria diferente a las ratas. En esta cepa de ratones es posible inducir uroporfiria por simple sobrecarga de hierro (339) mientras que en las ratas (326) o en otras cepas de ratones no (339).

Luego de la administración de HCB no pudo observarse acumulación de porfirinas en los tumores. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones de otros autores en distintos modelos experimentales (235, 237, 333) y con los resultados presentados en el capítulo anterior para las ratas con tumores mamarios inducidos por NMU.

Los resultados del presente trabajo muestran que los tumores inducidos por DENA, si bien sufrieron una inhibición en la actividad de PCL luego de la administración de HCB, esta inhibición no fue suficiente como para desregular el camino metabólico del hemo y producir inducción de ALA-sintasa y acumulación de porfirinas. Por otro lado, Smith y col. (238) informaron que tumores hepáticos inducidos luego de una larga exposición al HCB no mostraron diferencias con respecto al hígado circundante en el contenido de porfirinas y en las actividades enzimáticas. Sin embargo, debe señalarse que en este último trabajo, los tumores aparecieron alrededor de la semana 90 del tratamiento con HCB, cuando los animales ya habían desarrollado una porfiria masiva. En contraste, la inducción de los tumores realizada en el presente trabajo fue anterior a la producción de porfiria por HCB, el cual fue administrado por sólo 5 semanas y no se observó aparición de tumores debido a la administración del fungicida.

Stewart y col. (333) han informado que el HCB puede llegar a los tumores inducidos por DENA y como hemos visto en el capítulo anterior, se ha sugerido que el hierro y el citocromo P450 juegan un papel en la porfiria inducida por HCB, tanto experimental como humana. Teniendo en cuenta estos antecedentes y considerando que, aunque pequeña, se pudo observar una inhibición de PCL en el tumor, pueden evaluarse dos posibilidades: a) que haya habido difusión de inhibidores de PCL desde el hígado hacia el tejido tumoral. En este caso uno esperaría una menor inhibición en el tumor que en el hígado. Sin embargo esto fue cierto en el caso de las hembras pero no en los machos. b) que suficiente HCB hubiera alcanzado el tumor pero que no haya sido capaz de promover una importante inhibición de PCL como resultado del bajo contenido en hierro y/o a cambios en la relación de isoenzimas del citocromo P450, incrementando aquellas

que no están involucradas en el desencadenamiento de porfiria producida por HCB.

Los estudios realizados en este trabajo demuestran que: a) al igual que las ratas normales, las ratas hembras portadoras de tumores son más susceptibles a la porfirinogenicidad del HCB que las ratas machos, b) la presencia de tumores hepáticos es capaz de modificar la respuesta de los animales al HCB y c) el camino metabólico del hemo es funcional en los tumores inducidos por DENA tanto en hembras como en machos pero estos tumores son poco afectados por el HCB.

CAPITULO III

EFICACIA COMPARATIVA DE UROPORFIRINA I Y DEL DERIVADO DE HEMATOPORFIRINA COMO LOCALIZANTES DE TUMORES

La terapia fotodinámica del cáncer (PDT) es un tratamiento basado en la selectividad de captación y/o retención de una droga fotosensibilizante entre el tumor y el tejido normal (265). Los fotosensibilizantes más utilizados hasta el momento en los estudios clínicos han sido el derivado de hematoporfirina (HPD) y Photofrin II pero la búsqueda de compuestos con mejor eficiencia aún continúa.

En el presente estudio se analiza la eficacia de uroporfirina I (URO I) como localizante de tumores. Para ello se compara la captación por el tumor y la distribución tisular de URO I y de HPD ya que es de fundamental importancia familiarizarse con estos parámetros para poder elegir el tiempo óptimo que debe mediar entre la administración del fotosensibilizante y la exposición a la luz.

Los animales utilizados fueron ratones hembras de la cepa Balb c portadores de un tumor mamario transplantado y las porfirinas se inyectaron por vía intraperitoneal. Se midió la concentración de las porfirinas en el tumor y en los siguientes órganos: hígado, riñón, piel y pulmón.

Los detalles del tratamiento de los animales y las determinaciones se describen en Métodos.

III-1. Cinética de la distribución tisular de URO I y HPD.

En la figura 53 puede observarse la acumulación de URO I (5 y 20 mg/kg) y de HPD (20 mg/kg) en hígado y riñón en función del tiempo.

La máxima acumulación para ambas drogas y para ambos órganos fue obtenida a las 4 horas de la administración. Si bien a tiempos cortos, la cantidad de URO I en hígado y riñón fue mayor para la mayor dosis, a las 48 horas ya era similar.

Al comparar la acumulación de HPD y URO I se observa que en riñón las concentraciones de ambas porfirinas fueron similares hasta las 48 horas pero en hígado siempre fue mayor la cantidad de HPD. En este último órgano, la concentración de HPD llegó a ser cuatro veces la de URO I. A las 72 horas la concentración de HPD fue mayor que la de URO I en ambos órganos.

En la figura 54 se muestran los resultados obtenidos para piel y tumor luego de la administración de ambas porfirinas. Nuevamente la máxima acumulación ya se obtiene a las 4 hs para ambas porfirinas. Cuando se estudiaron las dos dosis de URO I se observó que si bien en ambos tejidos la cantidad de porfirina acumulada era menor para la menor dosis, a tiempos cortos y en el tumor, la diferencia fue muy marcada. Con la dosis de 20 mg/kg se encontró a las 4 horas, 4,5 veces más

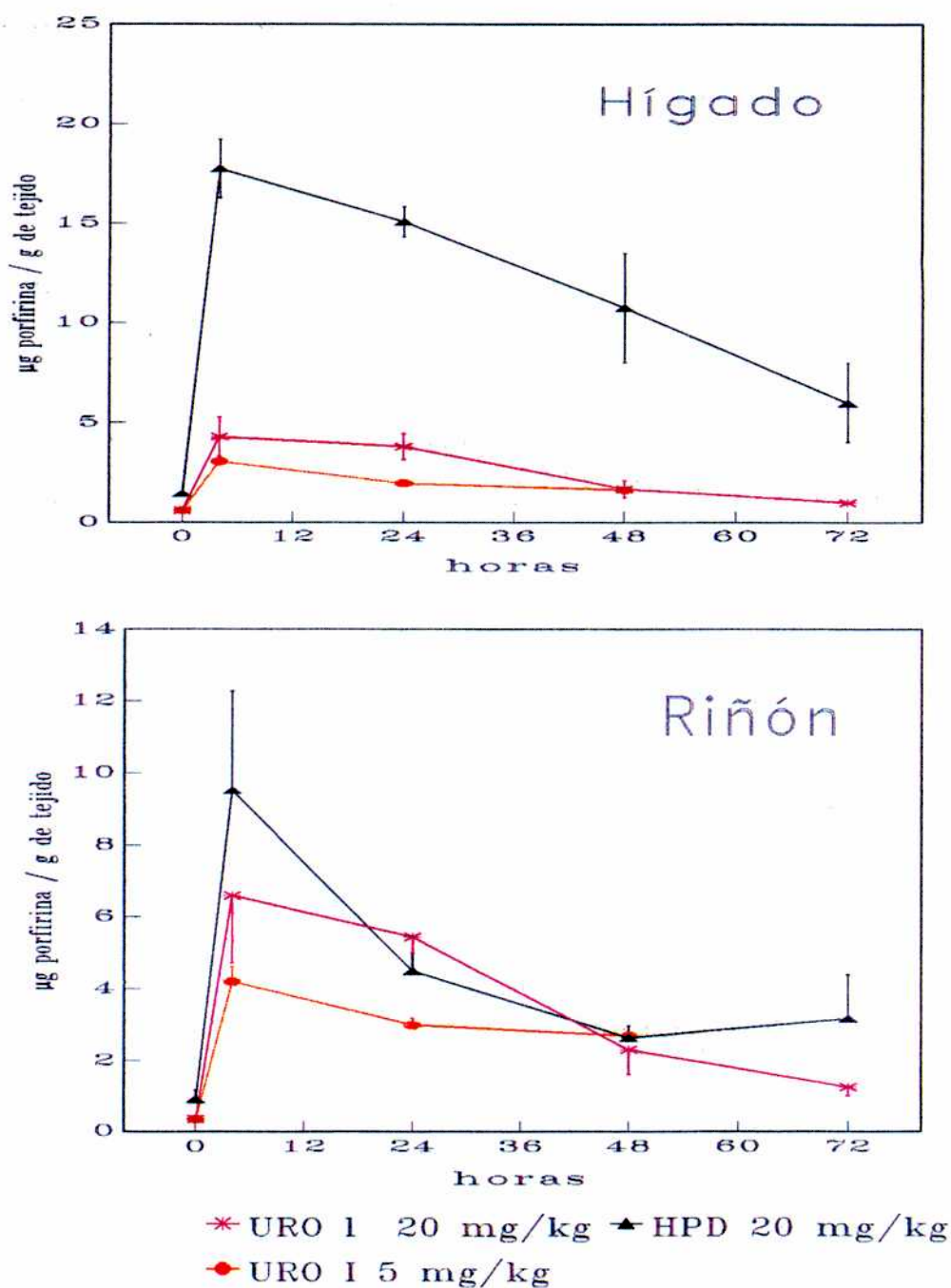


Figura 53: Contenido de URO I y HPD en hígado y riñón en función del tiempo post-administración. Cada punto representa el promedio $\pm$ S.E.M. de por lo menos 4 ratones. Los S.E.M. que no se muestran es porque fueron menores que el tamaño del símbolo.

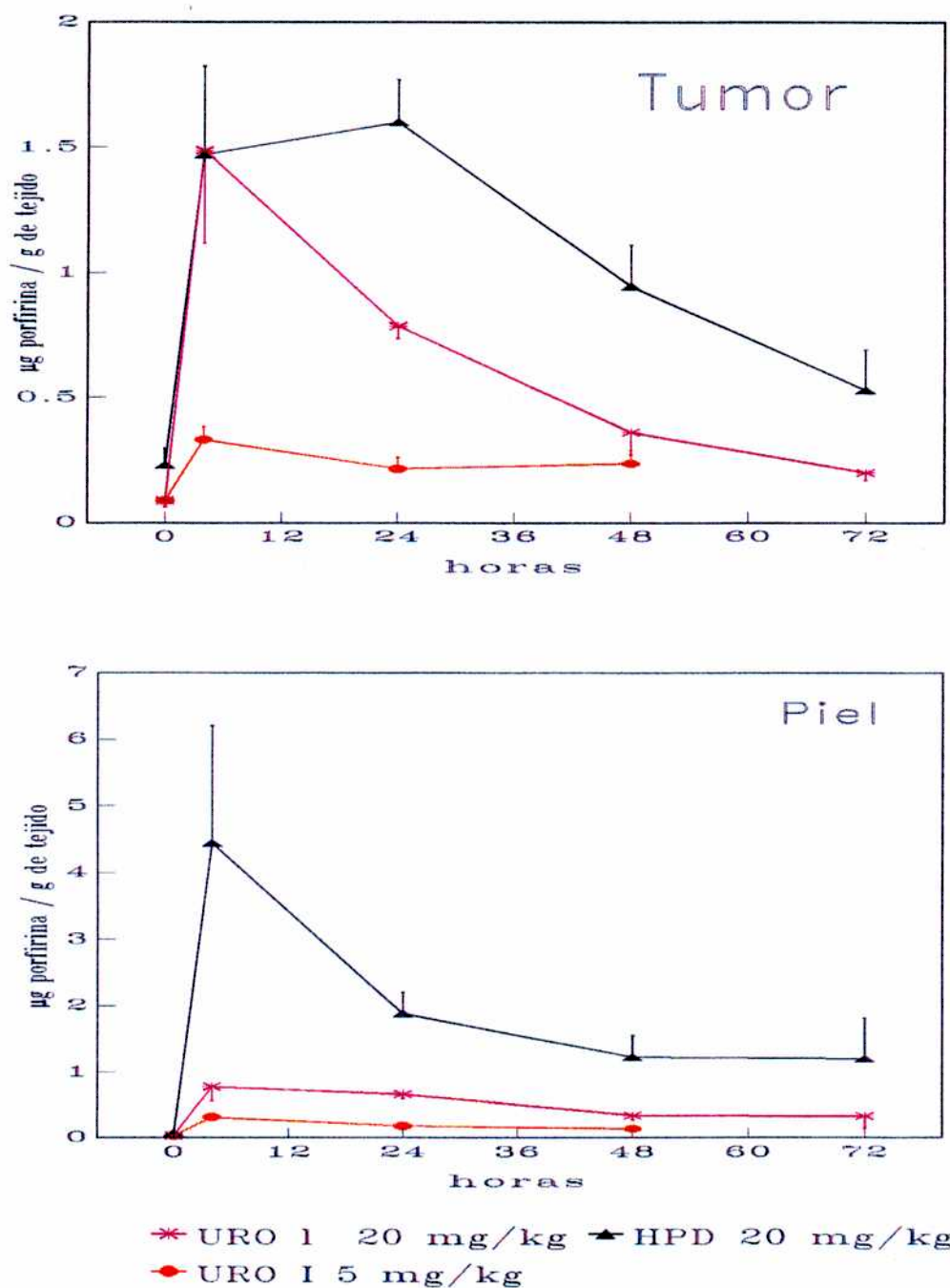


Figura 54: Contenido de URO I y HPD en tumor y piel en función del tiempo post-administración. Cada punto representa el promedio $\pm$ S.E.M. de por lo menos 4 ratones. Los S.E.M. que no se muestran es porque fueron menores que el tamaño del símbolo.

porfirina en el tumor que con la dosis de 5 mg/kg.

Es de destacar que la acumulación de HPD obtenida en piel a las 4 hs es 5,7 veces mayor que la obtenida con igual concentración de URO I en ese horario y que durante todo el tiempo ensayado la concentración de HPD se mantuvo superior a la de URO I. En el tumor, la concentración de ambas porfirinas a las 4 hs fue prácticamente idéntica pero ya a partir de las 24 hs la concentración de URO I fue menor que la de HPD.

La relación de concentraciones tumor/piel en los distintos horarios y para las dosis de 20 mg/kg puede verse en la Tabla V donde se observa que la mejor relación tumor/piel para URO I se obtuvo a las 4 hs y fue de 1,8 mientras que para HPD se obtuvo a las 24 hs y fue sustancialmente inferior a la obtenida con URO I (0,9 vs 1,8). La relación tumor / piel para URO I fue mayor que 1 hasta las 48 hs mientras que con HPD fue siempre inferior a 1, es decir que siempre fue mayor la cantidad de HPD en la piel que en el tumor.

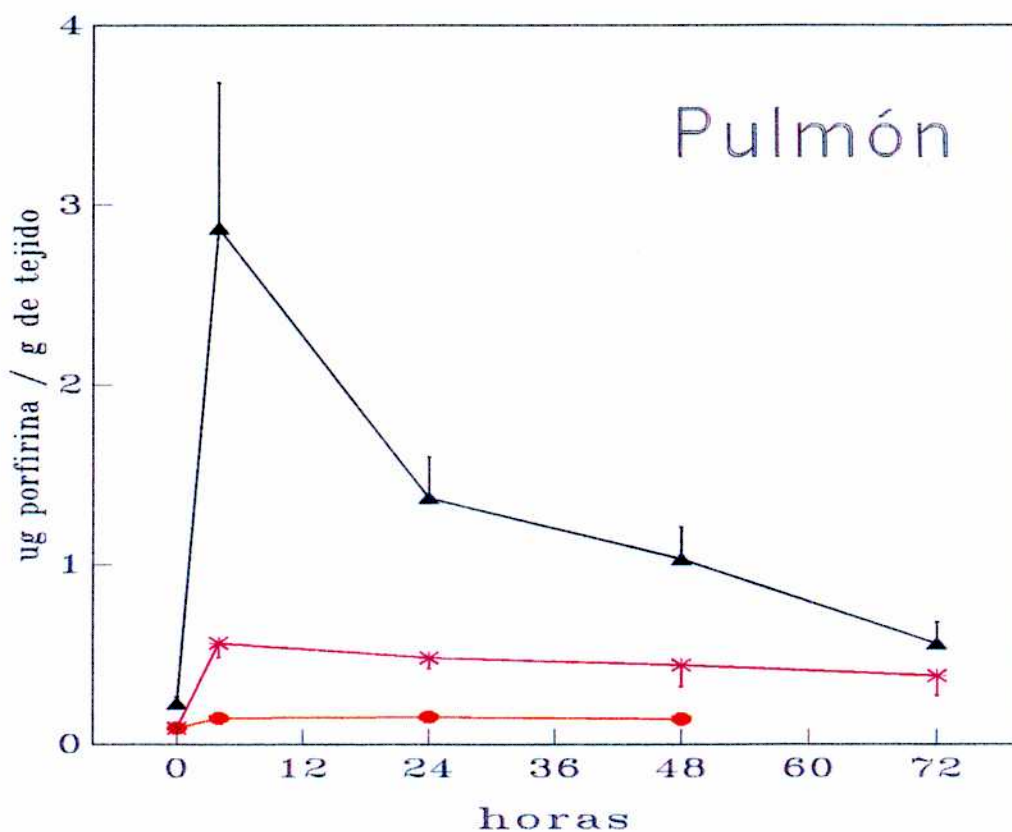
Tabla V: Relación de concentraciones de URO I y HPD en tumor y piel en función del tiempo

TIEMPO (horas)	Relación TUMOR/PIEL.	
	URO I	HPD
4	1,8	0,3
24	1,2	0,9
48	1,2	0,5
72	0,7	0,4

La dosis utilizada para ambas porfirinas fue de 20 mg/kg

La distribución de ambas porfirinas en el pulmón (Figura 55) fue muy similar a lo que ocurrió en piel e hígado, siendo la acumulación de HPD mayor a la de URO hasta las 48 hs.

En todos los casos analizados, la dispersión de los datos fue menor para URO I que para HPD y con ambas porfirinas siempre la fluorescencia fue mas intensa en la periferia que en el centro del tumor. Con la menor dosis de URO I no se pudo observar fluorescencia con la lámpara ultravioleta en ninguno de los tumores a todos los horarios ensayados.



* URO I 20 mg/kg ▲ HPD 20 mg/kg
● URO I 5 mg/kg

Figura 55: Contenido de URO I y HPD en pulmón en función del tiempo post-administración. Cada punto representa el promedio $\pm$ S.E.M. de por lo menos 4 ratones. Los S.E.M. que no se muestran es porque fueron menores que el tamaño del símbolo.

III-2. Discusión

En el presente trabajo se observó que la fluorescencia en el tumor era mayor en la periferia que en el centro. La misma observación fue reportada por otros autores en un modelo tumoral de vejiga y en pacientes humanos con carcinoma bronquial que recibieron HPD (287).

Similarmente a lo obtenido por El Far y col. (340) no hubo diferencias significativas entre la concentración de URO I y HPD en el pico de acumulación del tumor aunque las concentraciones y la relación de concentración tumor/piel obtenida por estos autores difieren de estos resultados. Ellos encontraron que la relación tumor/piel a las 6 hs y para una dosis de 20 mg de URO I/ kg fue de 8,7 y que aumentó con el tiempo. Esta discrepancia podría deberse a diferencias en el tumor utilizado o a la vía de inoculación ya que ellos inyectaron la porfirina por vía intravenosa mientras que en este trabajo se administró por vía intraperitoneal. No se pueden comparar las concentraciones en otros órganos ya que ellos no midieron la cinética de distribución en hígado, pulmón o riñón.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo en hígado, riñón y pulmón muestran que las porfirinas no son exclusivamente retenidas por el tumor. Kessel (341) y Woodburn y col. (342) sugirieron que la distribución de porfirinas estaría directamente asociada con el número de receptores de lipoproteína de baja densidad en estos tejidos (hígado > riñón > pulmón). Este orden se mantuvo para HPD pero no para URO I, ya que la concentración de esta porfirina fue mayor en riñón que en hígado. Otra teoría propone que el macrófago sería el principal sitio de acumulación del sensibilizante (265). Este mecanismo es atractivo para porfirinas que tienden a formar agregados pero no podría aplicarse como causa de la localización selectiva de URO I. A pesar de la alta concentración de URO I en hígado y riñón, esta porfirina es aún un buen candidato para ser utilizada en PDT ya que estos tejidos no serían directamente irradiados.

La menor concentración de URO I con respecto a HPD hallada en hígado, pulmón y piel, combinado con la mejor relación tumor/piel y con la menor dispersión en los datos obtenida con URO I hacen de esta última porfirina una mejor elección para una terapia fotoradiante ya que uno de los principales problemas de esta terapia es la fotosensibilidad cutánea secundaria debido a la acumulación de las porfirinas en piel.

Para encarar una terapia fotodinámica en este modelo y usando URO I , el tiempo óptimo para una exposición a la luz sería a tiempos cortos, es decir alrededor de las 4 hs posteriores a la administración intraperitoneal ya que es en este lapso en donde se encuentra la mejor relación tumor/piel.

CAPITULO IV

EFECTO DE VARIOS ANTINEOPLASICOS SOBRE EL CAMINO METABOLICO DEL HEMO

Teniendo en cuenta las graves y potencialmente fatales consecuencias que pueden seguir a la iniciación de ataques en pacientes con porfiria latente o declarada, es de fundamental importancia conocer qué drogas pueden ser utilizadas en porfiria así como cuáles pueden exacerbar la enfermedad.

Así, el presente estudio tuvo como primer objetivo estudiar la capacidad para producir una alteración en el camino metabólico del hemo de varios agentes utilizados comunmente para el tratamiento de distintos cánceres.

Para ello, se estudió el efecto de los antineoplásicos sobre la acumulación de porfirinas hepáticas y sobre la actividad de la enzima regulatoria ALA-sintasa, administrándole a los animales las drogas solas o en conjunción con DDC como modelo de porfiria latente. Los antineoplásicos ensayados fueron: ciclofosfamida, clorambucilo, melfalan, busulfano, azatioprina, fluorouracilo, hexametilmelamina, procarbazona y dacarbazina y como modelo experimental se utilizó principalmente al embrión de pollo de 17 días ya que esta especie es inusualmente sensible a los efectos porfirinogénicos de las drogas. Asimismo, aquellos antineoplásicos que indujeron mayor acumulación de porfirinas en los embriones de pollo también fueron ensayados en roedores.

Considerando la alta porfirinogenicidad de ciclofosfamida en el embrión de pollo, el siguiente objetivo fue investigar el mecanismo de acción porfirinogénico de esta droga. Con este propósito, se estudió la naturaleza de las porfirinas acumuladas, la actividad de ALA-sintasa, ferroquelatasa y protoporfirinógeno oxidasa y el contenido de citocromo P450. Asimismo, se estudió el efecto de un inductor y de un inhibidor del citocromo P450 (fenobarbital y SKF 525A, respectivamente) sobre la inducción de ALA-sintasa producida por ciclofosfamida y se investigó la posibilidad de que el metabolito de ciclofosfamida, acroleína, fuera el responsable de su actividad porfirinogénica.

Los detalles del tratamiento de los animales y las determinaciones se describen en Métodos.

IV-1. Efecto de ciclofosfamida, clorambucilo y melfalan sobre la acumulación de porfirinas.

Se estudió la acumulación de porfirinas hepáticas en embriones de pollo de 17 días que habían recibido distintas dosis de los antineoplásicos clorambucilo, melfalan y

ciclofosfamida solos y en conjunción con una pequeña dosis (0,25 mg/embrión) de DDC.

En el caso de melfalan se probaron dosis de 0,3; 0,5; 1; 5; 10 y 20 mg/embrión. No se observó acumulación de porfirinas con ninguna de las dosis ensayadas y por lo tanto sólo se muestran a modo de ejemplo los resultados obtenidos con dos de ellas (Figura 56). Para evaluar el efecto de DDC se trabajó con la dosis de 20 mg de melfalan/embrión pero no se consiguió una acumulación superior al control con DDC.

Con clorambucilo se ensayaron dosis de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 mg/embrión. Las dos últimas dosis resultaron ser tóxicas y los embriones murieron. En la Figura 57 puede verse que con ninguna de las dosis ensayadas se observó incremento en el contenido de porfirinas. Cuando se ensayó el efecto de este antineoplásico conjuntamente con DDC tampoco se observó aumento en el contenido de porfirinas.

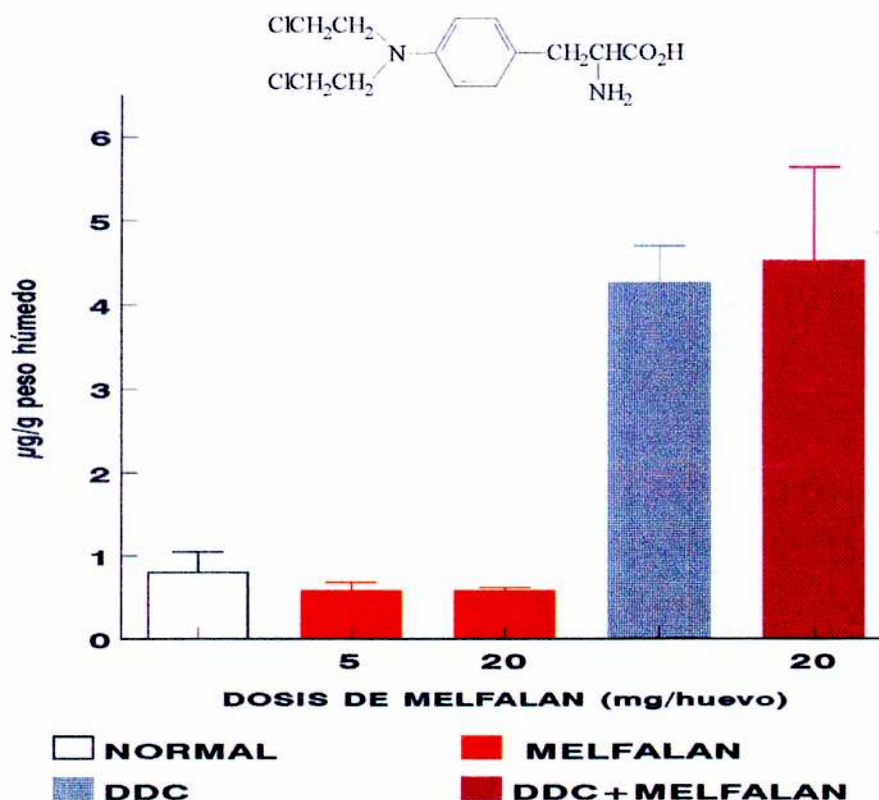


Figura 56: Contenido de porfirinas hepáticas en embriones de pollo de 17 días tratados con melfalan y con DDC + melfalan. La dosis de DDC fue de 0,25

mg/embrión. Los embriones fueron incubados a 37°C por 24 horas. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de por lo menos 4 embriones.

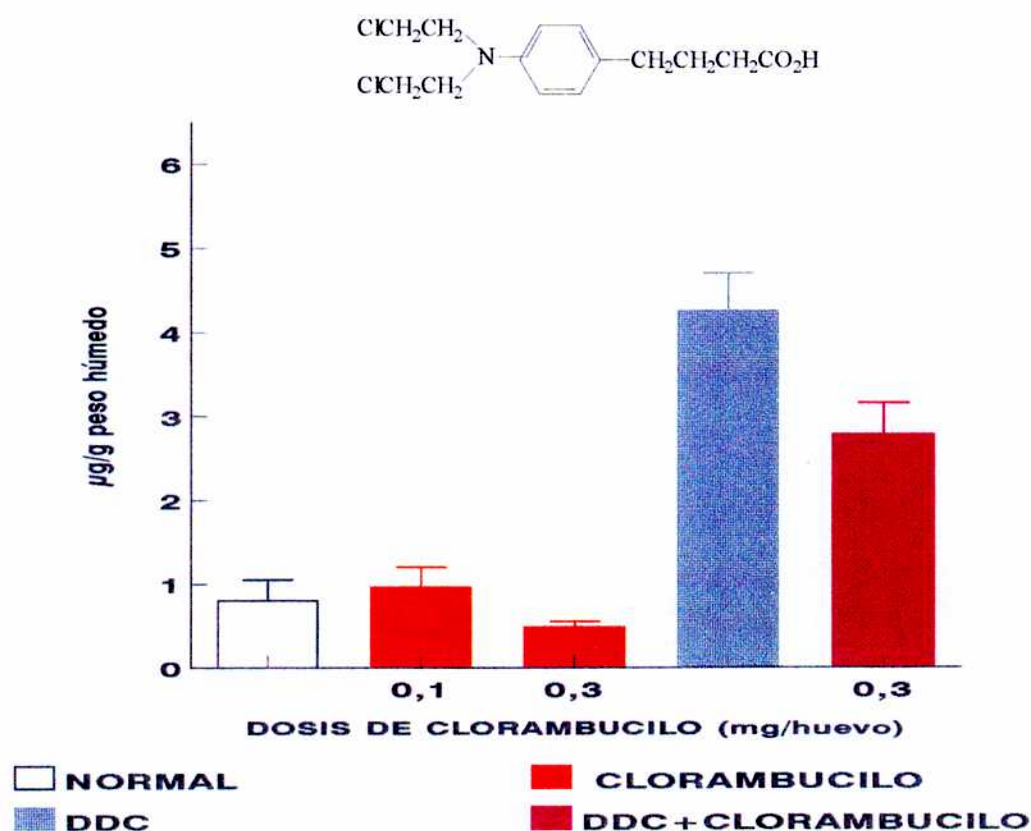


Figura 57: Contenido de porfirinas hepáticas en embriones de pollo de 17 días tratados con clorambucilo y con DDC + clorambucilo. La dosis de DDC fue de 0,25 mg/embrión. Los embriones fueron incubados a 37°C por 24 horas. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de por lo menos 4 embriones.

A diferencia de los resultados obtenidos con clorambucilo y melfalan, ciclofosfamida aumentó significativamente la acumulación de porfirinas hepáticas en una forma dosis dependiente, obteniéndose incrementos de 39,5 y 94 veces con respecto al control normal para las dosis de 5 y 10 mg/embrión respectivamente (Figura 58). Para evaluar

el efecto de DDC se trabajó con la dosis de 10 mg de ciclofosfamida / embrión. Con esta dosis se observó un aumento estadísticamente significativo en el contenido de porfirinas siendo este incremento de 46 veces el control con DDC.

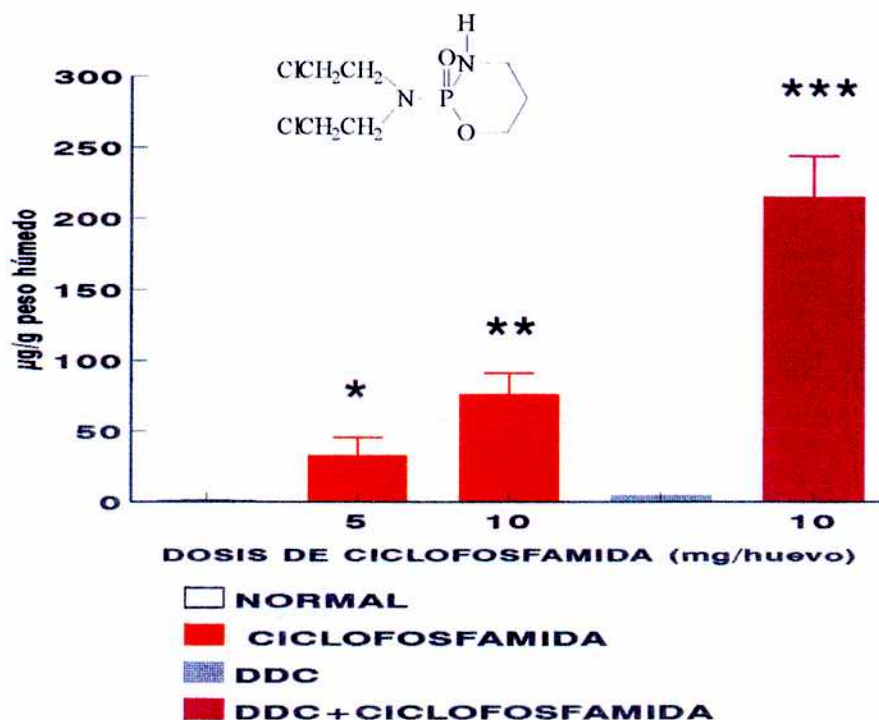


Figura 58: Contenido de porfirinas hepáticas en embriones de pollo de 17 días tratados con ciclofosfamida y con DDC + ciclofosfamida. La dosis de DDC fue de 0,25 mg/embrión. Los embriones fueron incubados a 37°C por 24 horas. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de por lo menos 4 embriones. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ vs normal y *** $p < 0,001$ vs DDC.

IV-2. Efecto de busulfano, azatioprina y fluorouracilo sobre la acumulación de porfirinas y la actividad de ALA-sintasa.

En las Figuras 59, 60 y 61 pueden observarse los resultados obtenidos en el contenido de porfirinas hepáticas cuando los embriones de pollo fueron inyectados con busulfano, azatioprina y fluorouracilo, solos y en conjunción con DDC.

Busulfano (Figura 59) fue ensayado en dosis de 5 y 20 mg/embrión. Sólo con la mayor dosis pudo obtenerse un incremento estadísticamente significativo en la concentración de porfirinas hepáticas siendo este aumento de 18 veces el valor control. Cuando se ensayó con DDC se utilizó la dosis de 5 mg de busulfano/embrión pues dosis mayores resultaban tóxicas. A pesar de que esta dosis por sí sola no provocó acumulación de porfirinas, al ensayarse conjuntamente con DDC la cantidad de porfirinas en el hígado se vió estadísticamente aumentada con respecto al control con DDC

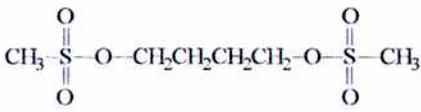
Azatioprina (Figura 60) y fluorouracilo (Figura 61) fueron ensayados en las dosis de 5 y 20 mg/embrión. Con ninguno de estos antineoplásicos se observó incremento en el contenido de porfirinas hepáticas a las dosis ensayadas. A pesar de esto, se estudió el efecto de DDC para ver si este tratamiento estimulaba la acumulación de porfirinas y se obtuvieron incrementos estadísticamente significativos de 7,8 y 5,9 veces con respecto al control con DDC para azatioprina y fluorouracilo respectivamente (Figuras 60 y 61). Similarmente a lo que ocurrió con busulfano, fluorouracilo se ensayó en la menor dosis pues una dosis de 20 mg/embrión dada conjuntamente con DDC resultó letal.

Con los tres antineoplásicos, tanto solos como con DDC, se ensayó la actividad de ALA-sintasa hepática. Esta actividad enzimática se midió a las 16 horas después del tratamiento con las drogas y en ningún caso se observó modificación de la actividad control (Tabla VI).

Tabla VI: Actividad de ALA-sintasa hepática luego del tratamiento de los embriones con azatioprina, fluorouracilo y busulfano, solos y en conjunción con DDC.

Grupo	Dosis de antineoplásico (mg/embrión)	DDC (mg/embrión)	ALA-sintasa (nmoles ALA/g hígado por hora)
Normal	---	---	3,1 ± 0,8
Azatioprina	10		2,8 ± 1,2
Fluorouracilo	5		4,5 ± 0,8
Busulfano	5	---	3,5 ± 1,5
DDC		0,25	7,4 ± 2,3
DDC + Azatioprina	10	0,25	9,8 ± 2,0
DDC + Fluorouracilo	5	0,25	5,9 ± 2,7
DDC + Busulfano	5	0,25	6,5 ± 2,0

Los resultados se expresan como promedios ± S.E.M. de por lo menos 4 embriones.



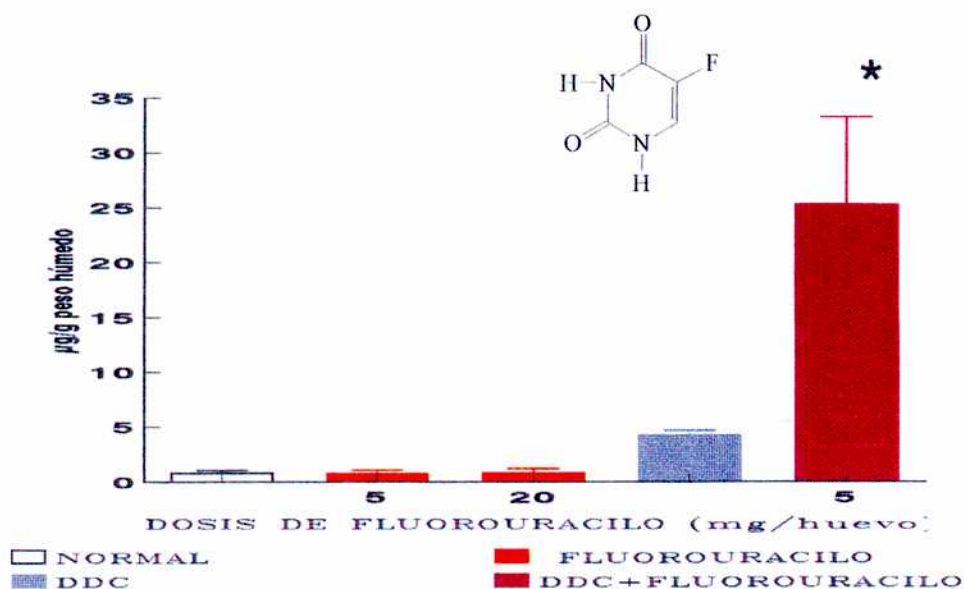


Figura 61: Contenido de porfirinas hepáticas en embriones de pollo de 17 días tratados con fluorouracilo y con DDC + fluorouracilo. La dosis de DDC fue de 0,25 mg/embrión. Los embriones fueron incubados a 37°C por 24 horas. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de por lo menos 4 embriones.

* $p < 0,01$ vs DDC.

IV-3. Efecto de dacarbazina sobre la acumulación de porfirinas y la actividad de ALA-sintasa.

El tratamiento de los embriones de pollo con dosis de 10 y 14 mg del antineoplásico provocó incrementos significativos en la acumulación de porfirinas de 15,5 y 13,8 veces el control (Figura 62). Una dosis menor (5 mg/embrión) no modificó significativamente el nivel de porfirinas y dosis mayores a 14 mg/embrión resultaron tóxicas. Cuando se trataron los embriones con DDC y 5 o 10 mg del antineoplásico no se observó un aumento en la respuesta ya que el valor obtenido no fue significativamente superior al obtenido con DDC solo.

Para investigar aún más el efecto de este antineoplásico sobre el camino metabólico del hemo, se estudió la actividad de la enzima ALA-Sintasa en embriones tratados con el antineoplásico sólo o con DDC y el antineoplásico. Como puede verse en la Figura 62 ninguno de los tratamientos modificó significativamente la actividad de esta enzima.

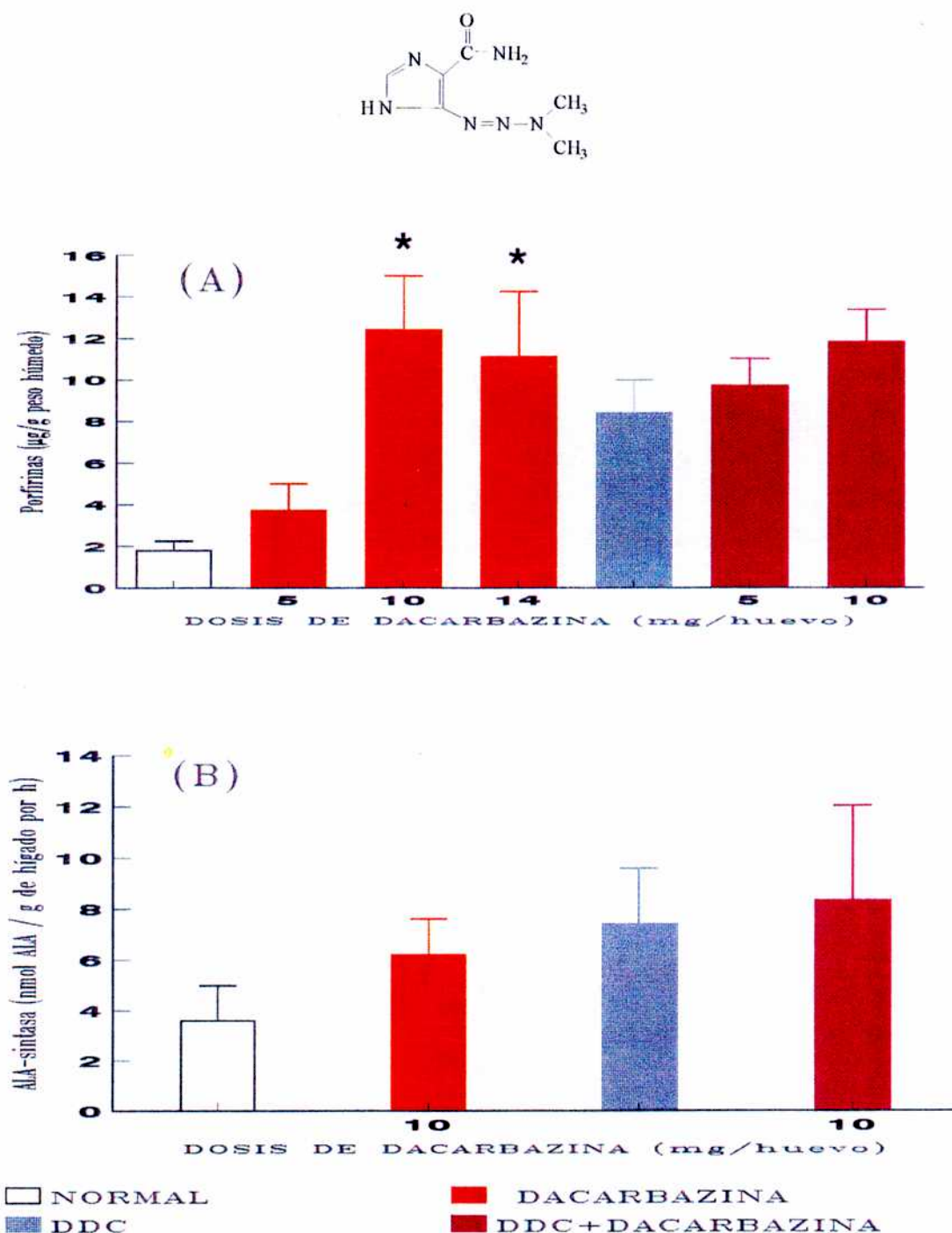


Figura 62: Contenido de porfirinas hepáticas (A) y actividad de ALA-sintasa (B) en embriones de pollo de 17 días tratados con dacarbazina y con DDC + dacarbazina. La dosis de DDC fue de 0,25 mg/embrión. Los embriones fueron incubados a 37°C por 24 horas para la determinación de porfirinas y por 16 horas para la determinación de la actividad enzimática. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de por lo menos 4 embriones. * $p < 0,01$ vs Normal

IV-4. Efecto de procarbazona sobre la acumulación de porfirinas y la actividad de ALA-sintasa.

Se estudió el efecto de este antineoplásico sobre los niveles de porfirinas hepáticas en dosis de 10 y 16 mg/embrión. Como puede verse en la Figura 63 ambas dosis produjeron incrementos estadísticamente significativos en el contenido de porfirinas de 7 y 5,8 veces el control. Dosis mayores a 16 mg/embrión fueron tóxicas.

Cuando se bloqueó el pasaje de protoporfirina IX a hemo con DDC se obtuvo un incremento significativo en la acumulación de porfirinas de 2 veces el control con DDC.

Al investigar el efecto de este antineoplásicos sobre la actividad de ALA-sintasa (Figura 63) se observó un aumento estadísticamente significativo en esta actividad enzimática sólo en el caso de la administración conjunta con DDC.

IV-5. Efecto de hexametilmelamina sobre la acumulación de porfirinas y la actividad de ALA-sintasa.

Como puede verse en la Figura 64 la hexametilmelamina no alteró el contenido de porfirinas hepáticas en dosis de 5 y 10 mg/embrión. Se intentó aumentar la dosis pero los embriones morían a las pocas horas. Al estudiar el efecto de la administración conjunta del antineoplásico y DDC se observaron aumentos estadísticamente significativos en el contenido de porfirinas. Así, una dosis de 5 mg/embrión produjo un incremento de 5 veces el control con DDC y una dosis de 10 mg/embrión produjo un aumento de 14 veces el control.

Cuando se ensayó el efecto de este antineoplásico sobre la enzima reguladora del camino metabólico del hemo se observó un incremento estadísticamente significativo sólo en el caso de la administración de DDC conjuntamente con el antineoplásico (Figura 64). Estos resultados se hallan en concordancia con lo observado en el caso de la acumulación de porfirinas.

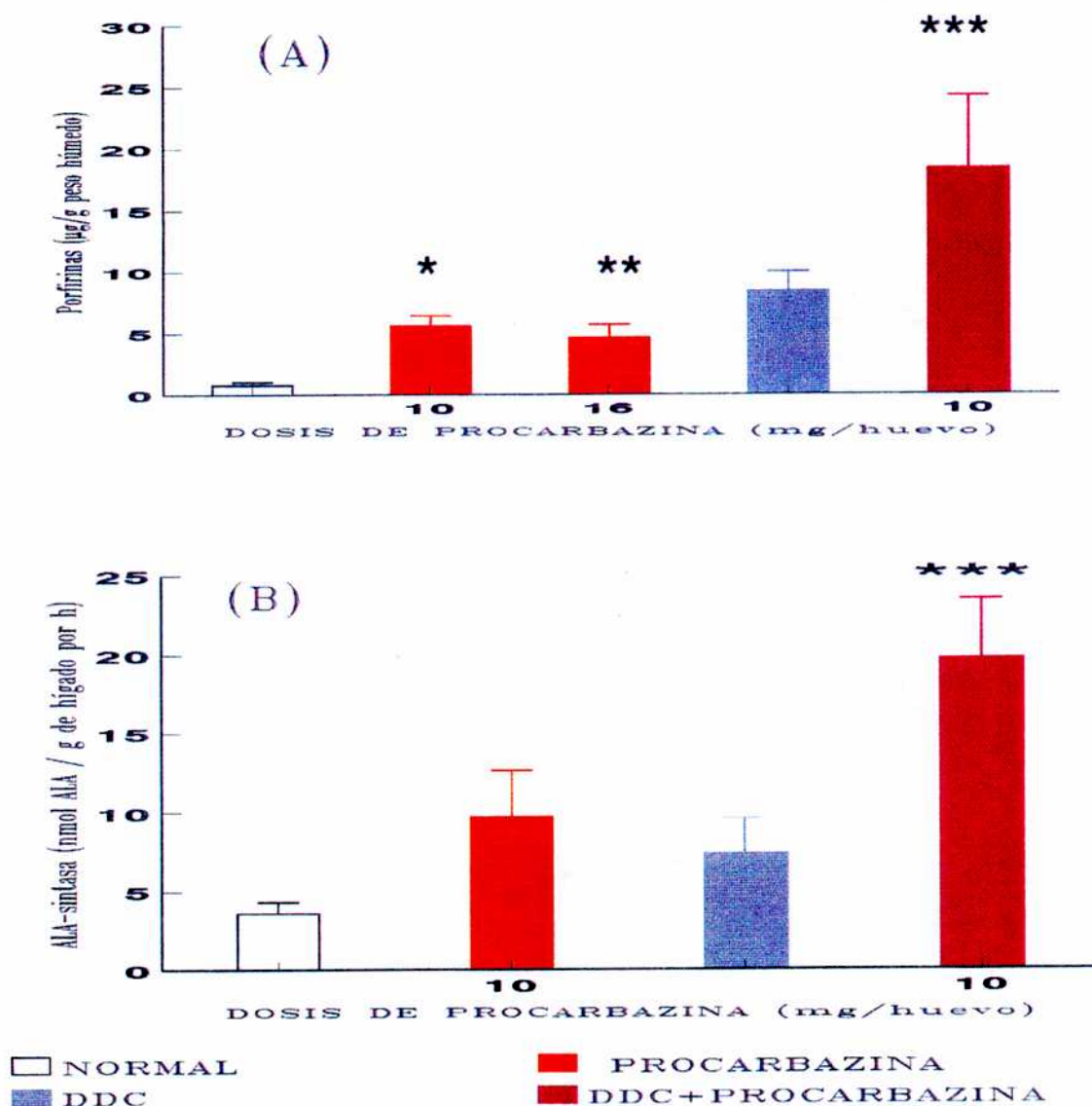
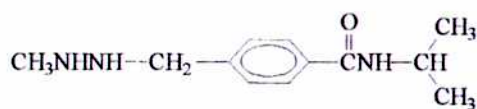


Figura 63: Contenido de porfirinas hepáticas (A) y actividad de ALA-sintasa (B) en embriones de pollo de 17 días tratados con procarbazine y con DDC + procarbazine. La dosis de DDC fue de 0,25 mg/embrión. Los embriones fueron incubados a 37°C por 24 horas para la determinación de porfirinas y por 16 horas para la determinación de la actividad enzimática. Los resultados se expresan como promedios ± S.E.M. de por lo menos 4 embriones. * p<0,01 y ** p<0,02 vs Normal y *** p<0,05 vs DDC.

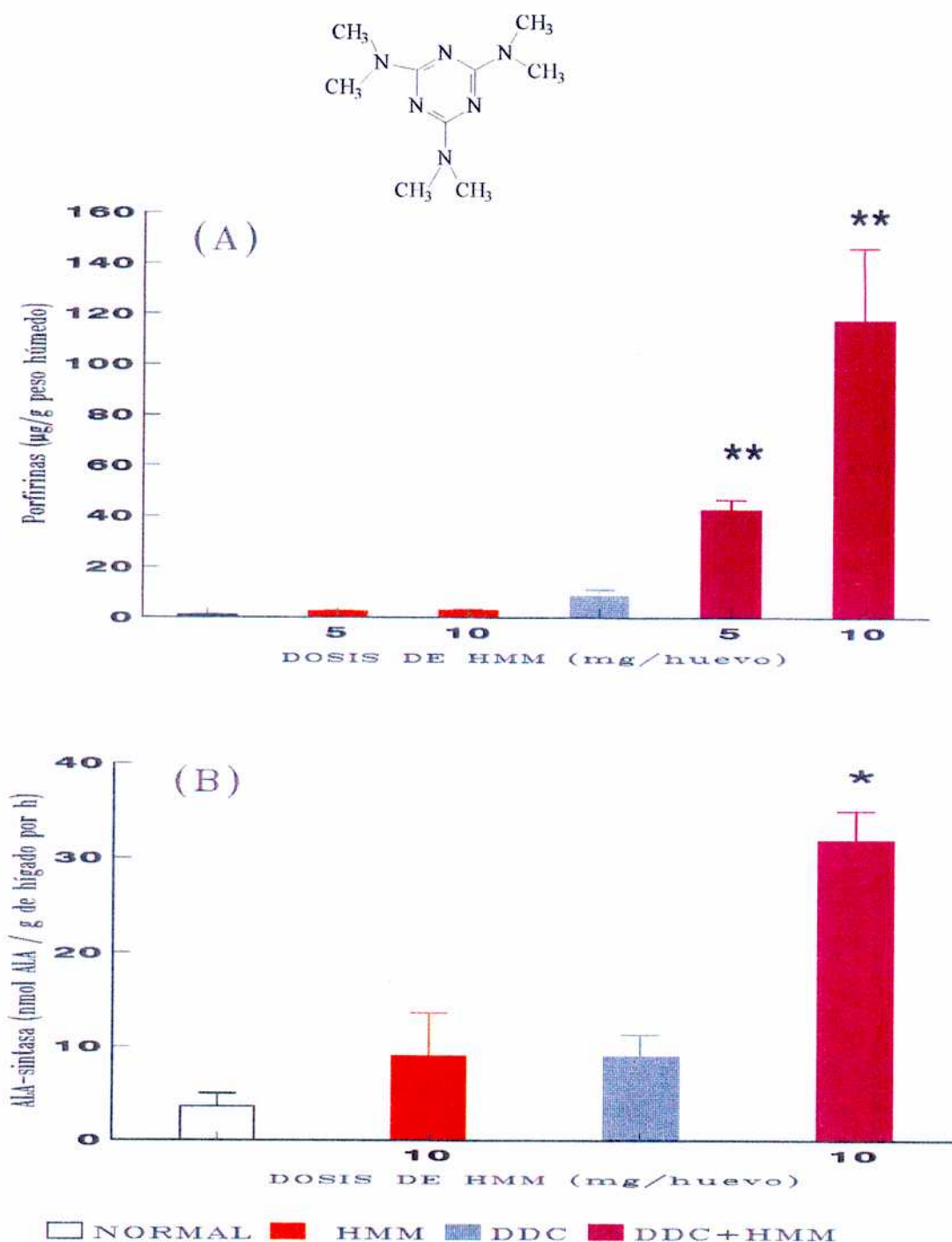


Figura 64: Contenido de porfirinas hepáticas (A) y actividad de ALA-sintasa (B) en embriones de pollo de 17 días tratados con hexametilmelamina (HMM) y con DDC + HMM. La dosis de DDC fue de 0,25 mg/embrión. Los embriones fueron incubados a 37°C por 24 horas para la determinación de porfirinas y por 16 horas para la determinación de la actividad enzimática. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de por lo menos 4 embriones. * $p < 0,01$ y ** $p < 0,001$ vs DDC.

IV-6. Efecto de ciclofosfamida en ratas

Como se vio que ciclofosfamida era altamente porfirinogénica en el embrión de pollo, se quiso ver si estos resultados también podían observarse en roedores. Para ello, se administró ciclofosfamida a ratas Wistar.

Antes del tratamiento con ciclofosfamida, el nivel de leucocitos en sangre fue de $8,8 \times 10^9$ leucocitos / litro, mientras que luego de 4 días de administración del antineoplásico el número disminuyó a casi la mitad ($4,9 \times 10^9$ leucocitos/litro). Sin embargo los valores de ALA y PBG urinarios se mantuvieron constantes durante todo el tratamiento (Tabla VII). En hígado, el contenido de porfirinas y la actividad de ALA-Sintasa no mostró diferencias con los valores normales aunque al mes del segundo tratamiento un animal mostró un contenido de porfirinas superior al normal ($10,6 \mu\text{g/g}$ hígado).

Tabla VII: Efecto de ciclofosfamida sobre el camino metabólico del hemo en ratas.

Tiempo (días)	ORINA			HIGADO	
	PBG ($\mu\text{g}/24\text{ h}$)	ALA ($\mu\text{g}/24\text{ h}$)	Porfirinas ($\mu\text{g/g}$ híg.)	Porfirinas ($\mu\text{g/g}$ híg.)	ALA-sintasa (nmol/g híg. por h)
0	$4,1 \pm 0,5$	$12,5 \pm 0,7$	$1,5 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,9$
15	$3,1 \pm 0,9$	$15,5 \pm 1,6$	$2,0 \pm 0,5$		
30	$2,8 \pm 0,8$	$17,4 \pm 1,9$	$2,0 \pm 0,2$		
Interrupción del tratamiento por 2 meses					
0	$3,5 \pm 0,5$	$12,7 \pm 2,6$	$1,9 \pm 0,1$		
15	$3,9 \pm 0,6$	$15,0 \pm 1,7$	$2,4 \pm 0,4$		
30	$3,3 \pm 0,6$	$16,9 \pm 1,8$	$3,0 \pm 0,3$	$4,5 \pm 3,1$	$5,3 \pm 0,7$
60	$3,4 \pm 1,2$	$16,8 \pm 3,3$	$2,9 \pm 0,5$		
90				$3,2 \pm 1,0$	$5,8 \pm 0,9$

Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M.

IV-7. Contenido de porfirinas hepáticas en ratones luego de la administración de DDC y ciclofosfamida, hexametilmelamina o azatioprina.

Los antineoplásicos que produjeron mayor acumulación de porfirinas en el embrión de pollo fueron administrados conjuntamente con DDC a ratones Balb/c hembras y machos. Como puede verse en la Tabla VIII, ninguno de los antineoplásicos provocó un aumento significativo en el contenido de porfirinas hepáticas. En dicha tabla se muestran los resultados obtenidos cuando se utilizó una dosis de DDC de 1 mg/kg. El mismo experimento se repitió con mayor cantidad de DDC (5 mg/kg) y si bien los ratones tratados con DDC acumularon más porfirinas que los normales, los tratados con ambas drogas no acumularon más que el control con DDC.

Tabla VIII: Acumulación de porfirinas hepáticas en ratones tratados con DDC y distintos antineoplásicos.

TRATAMIENTO	PORFIRINAS (μg / g hígado)	
	Machos	Hembras
NORMAL	1.8 ± 0.2	1.3 ± 0.2
DDC (1 mg/kg)	2.2 ± 0.2	1.6 ± 0.2
DDC (1 mg/kg) + CF (400 mg/kg)	1.7 ± 0.2	1.4 ± 0.1
DDC (1 mg/kg) + HMM (400 mg/kg)	2.0 ± 0.1	1.9 ± 0.2
DDC (1 mg/kg) + AZ (400 mg/kg)	2.3 ± 0.3	2.2 ± 0.5

Los ratones fueron sacrificados 16 horas después de haber recibido el tratamiento correspondiente. El DDC y los antineoplásicos fueron administrados conjuntamente por vía intraperitoneal. Los resultados se expresan como promedios $\pm$ S.E.M. de por lo menos cuatro animales. CF: ciclofosfamida, HMM: hexametilmelamina y AZ: azatioprina.

IV-8. Estudios sobre la acción porfirinogénica de ciclofosfamida y de su metabolito acroleína en embrión de pollo

IV-8.1. Naturaleza de las porfirinas acumuladas con ciclofosfamida

En la Tabla IX puede verse la naturaleza de las porfirinas hepáticas de embriones normales y tratados con ciclofosfamida o con AIA. Ciclofosfamida y AIA provocaron una gran acumulación de protoporfirina y una menor proporción de copro-, penta- y uro-porfirina mientras que en los embriones normales el porcentaje de coproporfirina es mucho mayor.

Tabla IX: Naturaleza de porfirinas acumuladas en hígado de embrión de pollo normal y embriones tratados con ciclofosfamida o AIA

TRATAMIENTO	PORFIRINAS ACUMULADAS					
	Proto-porfirina	Copro-porfirina	Penta-porfirina	Hexa-porfirina	Hepta-porfirina	Uro-porfirina
Normal	43%	57%	0%	0%	0%	5%
Ciclofosfamida	80%	5%	15%	0%	0%	0%
AIA	72%	8%	15%	0%	0%	0%

Los embriones fueron inyectados con ciclofosfamida (10 mg/embrión) o AIA (10 mg/embrión) y 24 horas después se sacrificaron.

IV-8.2. Efecto *in vivo* e *in vitro* de ciclofosfamida sobre la actividad de ALA-sintasa

La Figura 65 muestra que la administración *in vivo* de ciclofosfamida a los embriones de pollo de 17 días incrementa significativamente la actividad hepática de ALA-sintasa. Para poder determinar si este efecto era una activación o una inducción enzimática, se llevaron a cabo experimentos *in vitro*. Así, se agregó

ciclofosfamida al medio de incubación de tal forma de obtener concentraciones finales de este antineoplásico de 10^{-2} M, 10^{-3} M y 10^{-4} M (Figura 65). Se encontró que el agregado *in vitro* de ciclofosfamida no modificó significativamente la actividad de la enzima.

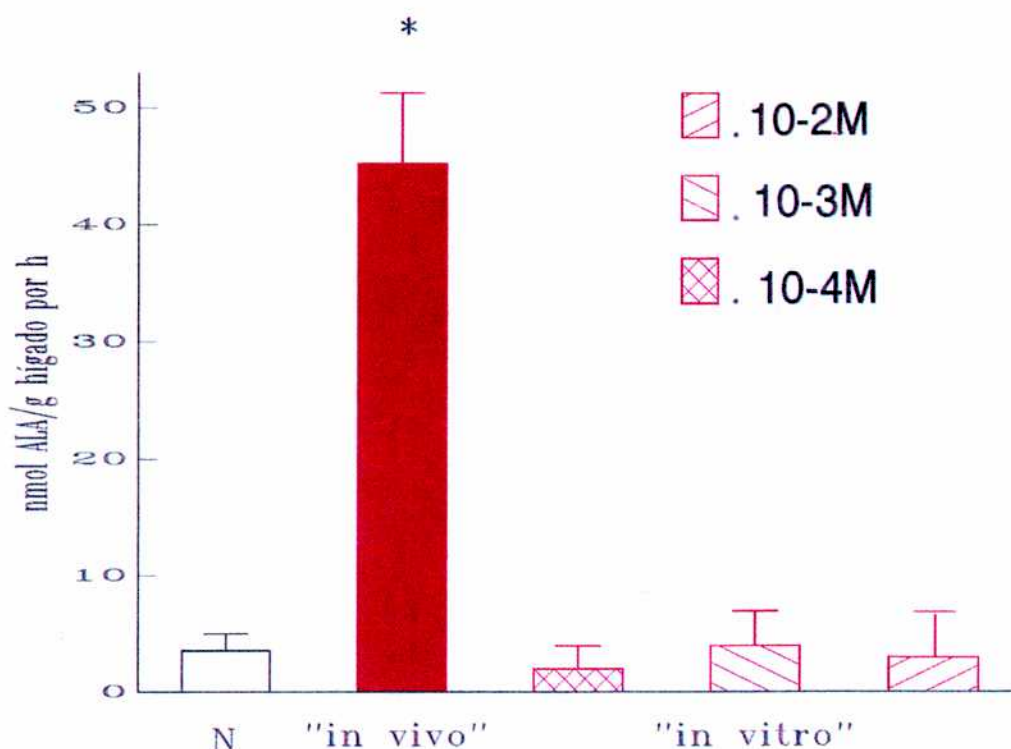


Figura 65: Efecto *in vivo* e *in vitro* de ciclofosfamida (CF) sobre la actividad de ALA-sintasa. Para los ensayos *in vitro* (barras rayadas), se agregó ciclofosfamida al medio de incubación en concentraciones finales de 10^{-2} M, 10^{-3} M y 10^{-4} M. Para los ensayos *in vivo* (barra oscura), los embriones de pollo se inyectaron con 10 mg de ciclofosfamida y 16 horas después se determinó la actividad enzimática de ALA-sintasa. Las barras representan promedios $\pm$ S.E.M. de 6-9 embriones. * $p < 0,001$: estadísticamente distinto de los animales normales (N).

IV-8.3. Actividad de ferroquelatasa y protoporfirinógeno oxidasa luego del tratamiento con ciclofosfamida

La gran acumulación de protoporfirina observada en los embriones tratados con ciclofosfamida sugeriría una posible acción de este antineoplásico sobre la enzima ferroquelatasa. Ciclofosfamida es un agente alquilante que es metabolizado

por el citocromo P450 y podría estar formando N-alquilprotoporfirina, un potente inhibidor de la ferroquelatasa. Por eso se decidió ensayar la actividad de esta enzima en embriones que habían sido tratados con los agentes alquilantes ciclofosfamida, busulfano, melfalan y clorambucilo y con antineoplásicos no alquilantes como azatioprina y fluorouracilo (Figura 66).

DDC, usado como control, provocó una inhibición del 65% mientras que con los otros antineoplásicos se obtuvieron inhibiciones del 15 al 30% salvo para ciclofosfamida en donde la actividad enzimática no se vio alterada. Hay que destacar que no se observaron diferencias en el porcentaje de inhibición entre los antineoplásicos que son agentes alquilantes y los que no.

Otra posible explicación para la acumulación de protoporfirina sería una inhibición de protoporfirinógeno oxidasa. La inhibición de esta enzima lleva a la acumulación del sustrato protoporfirinógeno IX, el cual puede oxidarse no enzimáticamente a protoporfirina IX. Se ensayó el efecto de ciclofosfamida sobre la actividad de protoporfirinógeno oxidasa *in vitro* e *in vivo*. Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla X. Los porcentajes de inhibición obtenidos no explican la gran acumulación de porfirinas observada en el hígado de los embriones tratados con ciclofosfamida.

Tabla X: Efecto *in vitro* e *in vivo* de ciclofosfamida sobre la actividad de protoporfirinógeno oxidasa hepática.

Tratamiento	Normal	Ciclofosfamida <i>in vitro</i>		Ciclofosfamida <i>in vivo</i>
		10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁴ M	10 mg/embrión
Protoporfirinógeno oxidasa (% de Inhibición)	-----	28%	36%	14,5%

Para los ensayos *in vitro* se agregó ciclofosfamida al medio de incubación en concentraciones finales de 10⁻⁵ M y 10⁻⁴ M. Para los ensayos *in vivo*, los embriones de pollo fueron inyectados con 10 mg de ciclofosfamida y se midió la actividad de protoporfirinógeno oxidasa 16 horas más tarde.

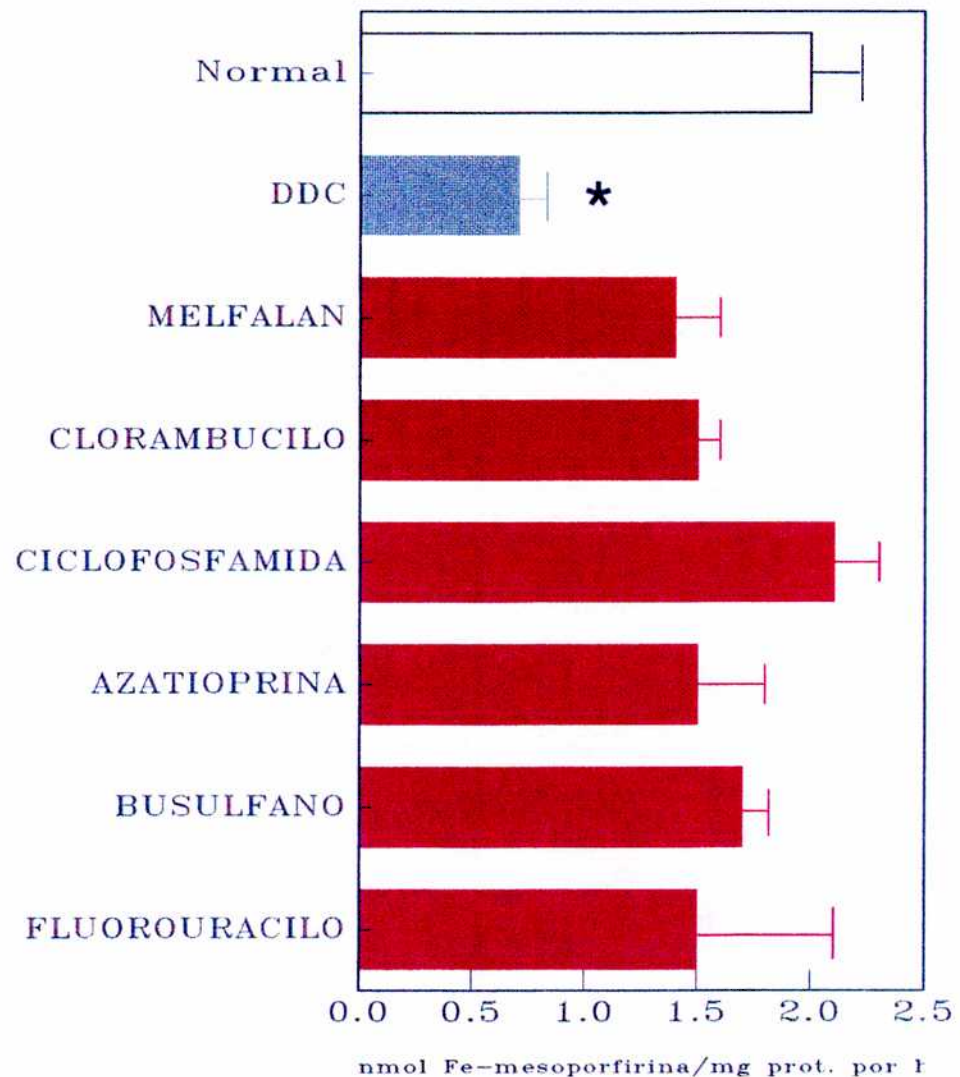


Figura 66: Actividad de ferroquelatasa hepática luego del tratamiento de los embriones de pollo con DDC o con distintos antineoplásicos. Las dosis por embrión utilizadas fueron: DDC: 0,25 mg, clorambucilo: 0,3 mg, busulfano y fluorouracilo: 5 mg, melfalan, ciclofosfamida y azatioprina: 10 mg. Los embriones fueron sacrificados por decapitación 16 horas después de haber recibido el tratamiento. Cada barra representa el promedio $\pm$ S.E.M. de 6 a 9 embriones.

* $p < 0,001$ significativamente diferente del valor normal.

IV-8.4 Pretratamientos con fenobarbital o con SKF-525A

Los embriones de pollo fueron tratados con 5 mg de fenobarbital, un inductor del citocromo P450, y luego de 3 o 5 horas con 10 mg de ciclofosfamida. La actividad de ALA-sintasa se midió 16 horas después de la administración del antineoplásico (Tabla XI).

Tabla XI: Efecto de fenobarbital (PB) sobre la inducción de la actividad de ALA-sintasa producida por ciclofosfamida (CF).

Grupo	Tiempo (horas)				
	0 h	3 h	5 h	19 h	21 h
	Compuesto inyectado			ALA-sintasa (nmoles ALA/g hígado por hora)	
Normal	DMSO	DMSO	----	4,9 ± 1,5	----
CF	DMSO	CF		46,9 ± 9,2**	
PB	PB	DMSO		12,4 ± 0,8**	
PB + CF	PB	CF	----	48,8 ± 3,9*	----
Normal	DMSO		DMSO		3,1 ± 0,9
CF	DMSO		CF		44,8 ± 9,4**
PB	PB		DMSO		8,9 ± 1,5***
PB + CF	PB	----	CF	----	67,0 ± 10,5*

Se muestran los resultados obtenidos en dos experimentos representativos. Los embriones de 17 días se inyectaron con ciclofosfamida 16 horas antes de su sacrificio. Cada embrión recibió 10 mg de ciclofosfamida o 5 mg de fenobarbital disueltos en 0,1 ml de DMSO o 0,1 ml de DMSO sólo. Cada valor representa el promedio ± S.E.M. de cinco embriones. *p<0,001, **p<0,01 y ***p<0,02 estadísticamente significativos con respecto a los animales normales.

La administración de fenobarbital 3 horas antes de la administración de ciclofosfamida (Tabla XI) mostró una inducción de ALA-sintasa similar a la observada con ciclofosfamida sola. Cuando el fenobarbital fue administrado 5 horas antes que el antineoplásico, la actividad de ALA-sintasa en los embriones tratados con ambas drogas fue mayor que en los embriones tratados con ciclofosfamida sola pero este incremento no representa un efecto sinérgico.

Por otro lado, los embriones de pollo fueron tratados con 0,5 mg de SKF-525A, un inhibidor del citocromo P450 inducible por fenobarbital, en conjunción con 10 mg de ciclofosfamida (Tabla XII). Ni la administración simultánea de SKF-525A y ciclofosfamida ni la preincubación por 1 hora con el inhibidor, disminuyeron la inducción de la actividad de ALA-sintasa producida por ciclofosfamida sola.

Tabla XII: Efecto de SKF-525A sobre la inducción de la actividad de ALA-sintasa producida por ciclofosfamida (CF).

Grupo	Tiempo (horas)			
	0 h	1 h	16 h	17 h
	Compuesto inyectado		ALA-sintasa (nmoles ALA/g hígado por h)	
Normal	DMSO	----	2,8 ± 1,0	----
CF	CF		42,6 ± 10,0**	
SKF-525A	SKF-525A		4,4 ± 2,6	
SKF-525A + CF	SKF-525A + CF	----	41,0 ± 4,8*	----
Normal	sol. salina	DMSO		3,6 ± 1,4
CF	sol. salina	CF		38,7 ± 10,9***
SKF-525 A	SKF-525A	DMSO		12,9 ± 7,6
SKF-525A + CF	SKF-525A	CF	----	31,7 ± 2,8*

Se muestran los resultados obtenidos en dos experimentos representativos. Los embriones de 17 días se inyectaron con ciclofosfamida 16 horas antes de su sacrificio. Cada embrión recibió 10 mg de ciclofosfamida en 0,1 ml de DMSO o 0,5 mg de SKF-525A en 0,1 ml de solución salina. Cada valor representa el promedio ± S.E.M. de cuatro embriones. *p<0,001, **p<0,01 y ***p<0,02 estadísticamente significativos con respecto a los animales normales.

IV-8.5 Actividad de ALA-sintasa en función del tiempo luego de tratamientos con AIA, ciclofosfamida o acroleína

Se ensayó la actividad de ALA-sintasa en los hígados de los embriones tratados con AIA (un inductor de ALA-sintasa de conocida potencia), ciclofosfamida o acroleína (Figura 67). La dosis de acroleína utilizada fue de 0,4 mg/embrión ya que mayores dosis eran letales. Como puede verse en la Figura 67, ciclofosfamida produjo una inducción del mismo orden que la producida por AIA. Sin embargo, el metabolito de ciclofosfamida, acroleína, no modificó la actividad basal de ALA-sintasa. Así, se obtuvieron valores dentro del rango normal en todos los tiempos ensayados.

Cuando se estudió el efecto de distintas dosis (0,1; 0,2 y 0,4 mg/embrión) de acroleína sobre la acumulación de porfirinas hepáticas se observaron siempre valores dentro del rango normal. Para la dosis de 0,4 mg de acroleína/embrión se obtuvo un valor de $0,92 \pm 0,14$ µg de porfirinas totales/g de hígado siendo el valor normal de $0,85 \pm 0,25$ µg de porfirinas totales/g de hígado.

IV-8.6 Contenido de citocromo P450 en función del tiempo

La Figura 68 muestra el efecto de la administración a los embriones de pollo de ciclofosfamida, acroleína o fenobarbital sobre el contenido microsomal hepático del citocromo P450. Los resultados obtenidos indican que tanto fenobarbital como ciclofosfamida son potentes inductores de esta hemoproteína mientras que acroleína no modifica el contenido del citocromo P450.

Debe señalarse que no se pudo detectar ningún decremento en el contenido de citocromo P450 después del tratamiento con ciclofosfamida o acroleína. Esto no fue debido a baja sensibilidad del método empleado ya que cuando los embriones fueron tratados con AIA, se observó pérdida del citocromo P450 una hora después del tratamiento (Figura 69).

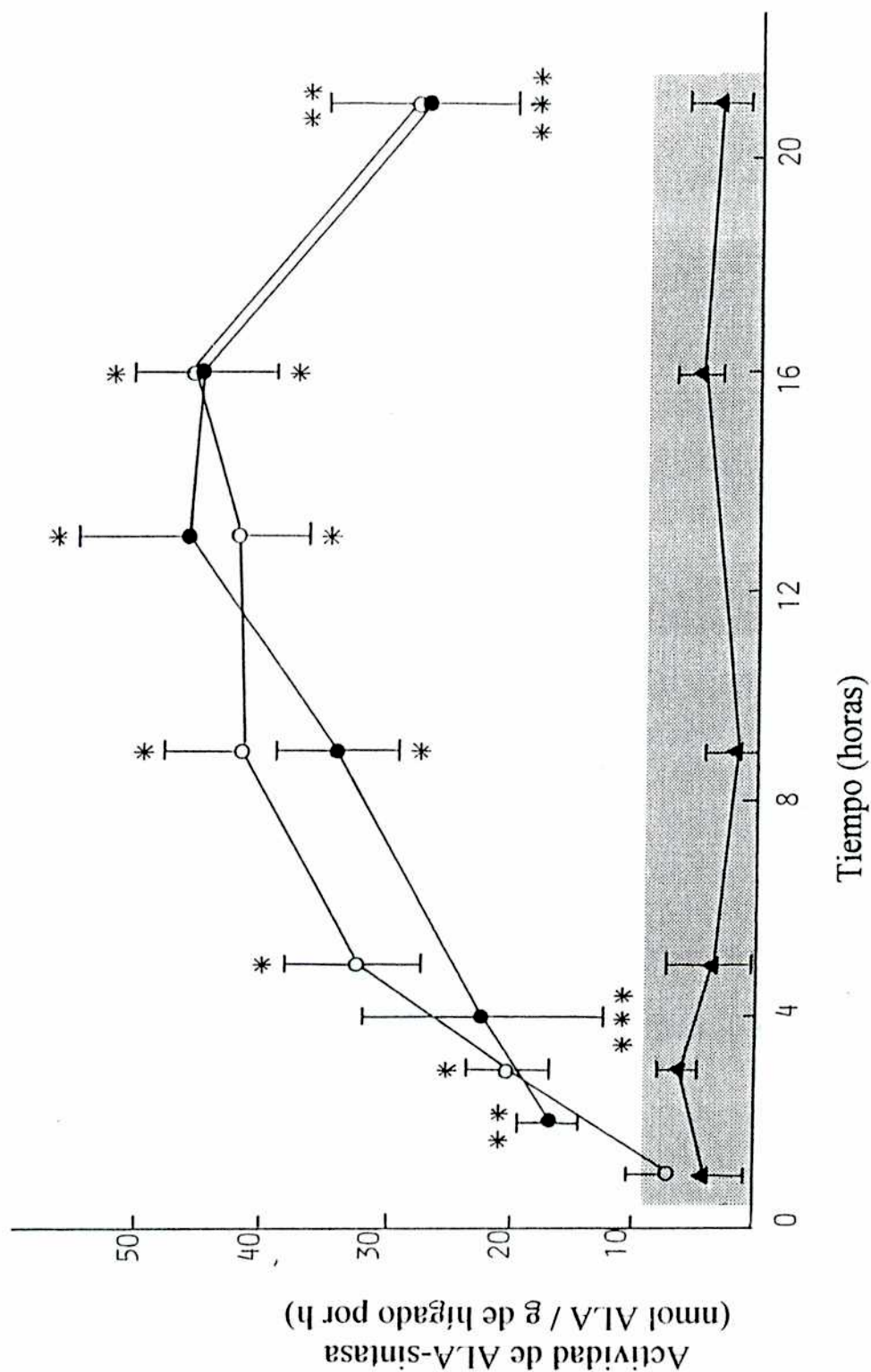


Figura 67: Actividad de ALA-sintasa en función del tiempo de incubación luego del tratamiento de los embriones con 10 mg de AIA (O), 10 mg de ciclofosfámina (●) o 0,4 mg de acroleína (▲). Los embriones fueron sacrificados a los tiempos indicados en las abscisas. Cada punto representa el promedio $\pm$ S.E.M. de 4-6 animales. El área sombreada representa el rango de valores normales. * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,05$ significativamente diferente del valor normal.

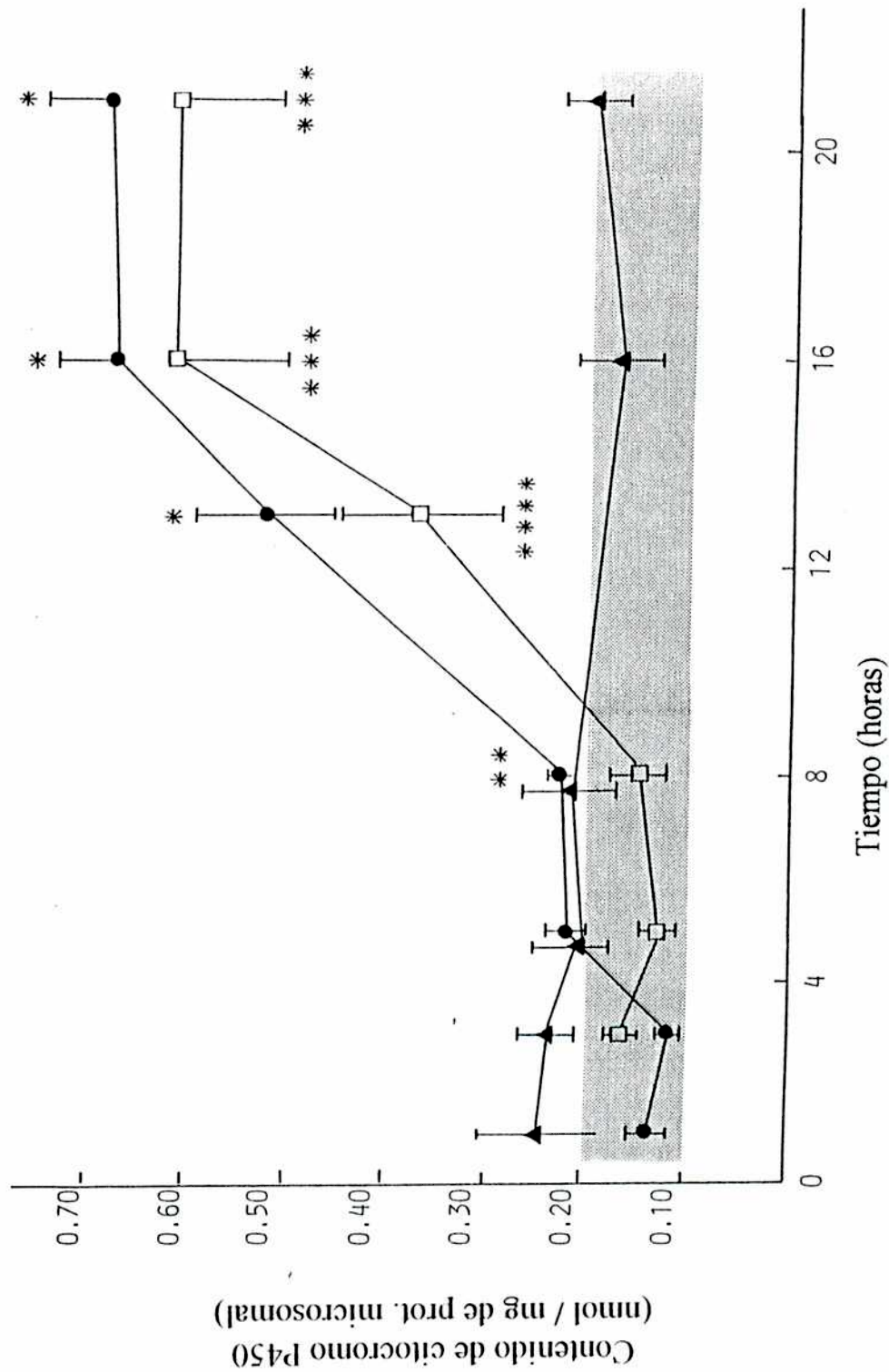


Figura 68: Contenido microsomal hepático del citocromo P450 en función del tiempo de incubación luego del tratamiento de los embriones con 10 mg de ciclofosfamida (●), 5 mg de fenobarbital (□) o 0,4 mg de acroleína (▲). Los embriones fueron sacrificados a los tiempos indicados en las abscisas. Cada punto representa el promedio $\pm$ S.E.M. de 6-8 animales. El área sombreada representa el rango de valores normales. * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,02$ y **** $p < 0,05$ significativamente diferente del valor normal.

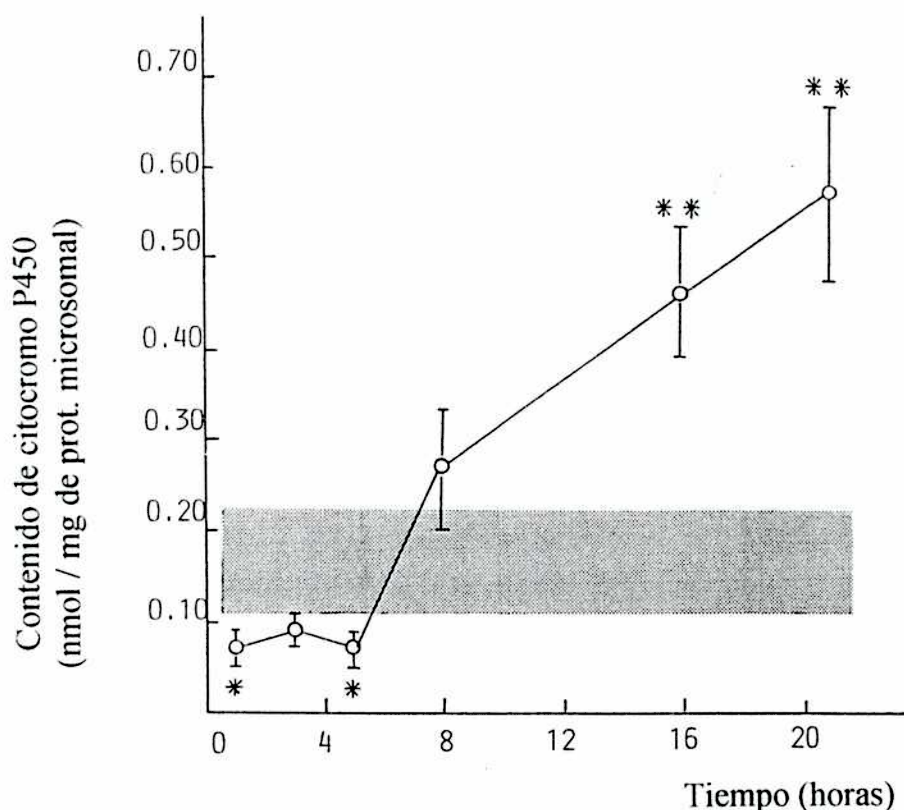


Figura 69: Contenido microsomal hepático del citocromo P450 en función del tiempo de incubación luego del tratamiento de los embriones con 10 mg de AIA (O). Los embriones fueron sacrificados a los tiempos indicados en las abscisas. Cada punto representa el promedio $\pm$ S.E.M. de 4 animales. El área sombreada representa el rango de valores normales. * $p < 0,01$ y ** $p < 0,05$ significativamente diferente del valor normal.

IV-9. Discusión

Diferentes drogas precipitan ataques de porfiria hepática y es importante determinar qué drogas podrían ser administradas a pacientes con porfiria hereditaria clínicamente latente. Una gran variedad de animales ha sido utilizada para testear la porfirinogenicidad de drogas (embriones de pollo, ratas, ratones y conejos) y frecuentemente una droga induce acumulación de porfirinas en un sistema y no en otro (343). Por ejemplo, recientemente se informó de un nuevo agente porfirinogénico (1-[4-(3-acetil-2,4,6 trimetilfenil)-2,6-ciclohexanodionil]-O-etilpropionaldehído oxima, ATMP) que causa porfiria en ratones pero que no es capaz de alterar la biosíntesis del hemo en ratas, hamster o el embrión de pollo *in ovo* (344).

El embrión de pollo es inusualmente sensible a los efectos porfirinogénicos de distintos compuestos y se ha postulado que reflejaría mejor la susceptibilidad humana a la exacerbación de la porfiria clínica que los mamíferos (175). En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que si bien ciclofosfamida es altamente porfirinogénica en el embrión de pollo no lo es ni en ratas Wistar hembras ni en ratones Balbc a pesar de haber sido éstos previamente sensibilizados con DDC. Asimismo, Palma Carlos y col. (244) estudiaron el efecto de ciclofosfamida sobre el camino metabólico del hemo en ratas Sprague-Dawley y en conejos y no pudieron obtener resultados consistentes. Sin embargo existe un informe de desencadenamiento de porfiria cutánea tarda en una mujer luego de haber sido tratada con ciclofosfamida (243). Este informe en humanos conjuntamente con los resultados obtenidos en el embrión de pollo indicarían que ciclofosfamida debe ser evitada para el tratamiento del cáncer en personas que exhiben una porfiria declarada o llevan el rasgo hereditario latente.

De todos los demás antineoplásicos ensayados en el embrión de pollo, solamente busulfano, dacarbazina y procarbazina fueron capaces de provocar por sí solos acumulación de porfirinas aunque lo hicieron en un grado mucho menor que ciclofosfamida y ninguno pudo inducir la actividad de ALA-sintasa. Dacarbazina no provocó acumulación de porfirinas ni inducción de ALA-sintasa cuando se la ensayó conjuntamente con DDC lo que sugiere que no sería porfirinogénica en el embrión de pollo. Asimismo tampoco son porfirinogénicos en este sistema clorambucilo y melfalan.

Aunque no lo hicieron en igual grado, tanto azatioprina como fluorouracilo, busulfano, procarbazina y en especial hexametilmelamina perturbaron el camino metabólico del hemo en el hígado de los embriones de pollo tratados con DDC. Si bien existen algunos casos en los que una droga que es porfirinogénica en un modelo experimental puede ser utilizada sin problemas para el tratamiento de personas porfíricas, en la mayoría de los casos la capacidad de un dado compuesto para producir porfiria experimental se correlaciona muy bien con su capacidad de exacerbar las manifestaciones clínicas de la porfiria (175). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo, se recomienda evitar el uso de azatioprina, fluorouracilo, busulfano, procarbazina y hexametilmelamina en el tratamiento de neoplasias en personas porfíricas o predispuestas a esta enfermedad.

Ni melfalan ni clorambucilo provocaron acumulación de porfirinas cuando fueron administrados solos o en conjunción con DDC. Estas drogas pertenecen junto con ciclofosfamida al grupo de las mostazas nitrogenadas. La diferencia en su acción sobre el camino del hemo, a pesar de poseer los tres antineoplásicos el mismo grupo alquilante: $(\text{Cl}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2\text{N}-$, podría residir en que ciclofosfamida

interacciona con el citocromo P450 ya que debe ser metabolizada por esta hemoproteína para poder actuar como agente alquilante dando origen a dos metabolitos activos: mostaza fosforamida y acroleína. En cambio ni clorambucilo ni melfalan necesitan ser metabolizados para ser alquilantes y la mayor parte de estas drogas se degrada por hidrólisis (241).

Los principales contribuyentes a la 4-hidroxilación de ciclofosfamida en el hígado no inducido de ratas machos adultas son los citocromos P450 2C11, una forma macho-específica expresada constitutivamente y el citocromo P450 2C6 (antiguamente denominado citocromo P450 PB-1), una forma que se expresa constitutivamente pero que también es inducible por fenobarbital. El citocromo P450 2B1 (también conocido como citocromo P450 PB4), una forma que también es inducible por fenobarbital, muestra un alto nivel de actividad 4-hidroxilasa de ciclofosfamida pero no se expresa significativamente en ratas no inducidas (345). Misra y col. (346) observaron que ciclofosfamida también puede ser activada a metabolitos reactivos por los microsomas de hígado de pollo normal e inducido por fenobarbital.

En el presente trabajo, no se encontraron modificaciones en la actividad porfirinogénica de ciclofosfamida, tratando los embriones de pollo con fenobarbital o con SKF-525 A, un inhibidor del citocromo P450 inducible por fenobarbital. Asimismo, Sladek (347) informó que a pesar de que el fenobarbital incrementa la velocidad de metabolización de ciclofosfamida en ratas, su administración no tiene efecto sobre la eficacia total del antineoplásico.

La actividad de ALA sintasa, la primera enzima y la limitante de la velocidad del camino metabólico del hemo, está regulada por los niveles del "pool" hepático de hemo libre y su regulación puede darse en diferentes niveles: transcripción, traducción y translocación del citosol a la mitocondria (153). Dado que la mayor parte del hemo sintetizado en los hepatocitos es utilizado para la síntesis de los citocromos P450, los compuestos que interactúen con esta hemo proteína destruyéndola, provocarían una disminución en los niveles de hemo lo que a su vez resultaría en una inducción de ALA sintasa. Este mecanismo ha sido propuesto para la droga porfirinogénica AIA (348).

Teniendo en cuenta que se ha reportado que ciclofosfamida al metabolizarse produce acroleína y que este último compuesto destruye al citocromo P450 hepático de ratas por alquilación de grupos sulfhidrílicos específicos (240, 349), varios autores sugirieron un mecanismo de acción porfirinogénica para ciclofosfamida similar al de AIA (243,245). Los resultados obtenidos en el presente trabajo no convalidan esta última hipótesis ya que no se pudo observar pérdida del contenido de citocromo P450 después del tratamiento de los embriones

de pollo con ciclofosfamida o con acroleína y la administración de acroleína ni indujo la actividad de ALA sintasa ni provocó acumulación de porfirinas hepáticas.

Cuando se analizó la naturaleza de las porfirinas acumuladas en el hígado de los embriones de pollo tratados con ciclofosfamida se vio un alto porcentaje de protoporfirina. Las posibilidades para explicar esta acumulación son tres: a) inhibición de ferroquelatasa, b) inhibición de protoporfirinógeno oxidasa y c) que el incremento de ALA-sintasa producido por la administración del antineoplásico sea lo suficientemente grande como para hacer que la enzima ferroquelatasa sea la limitante de la velocidad en la biosíntesis del hemo. Esta última hipótesis sería la que mejor se ajusta a los resultados obtenidos ya que el tratamiento de los embriones con ciclofosfamida no modificó la actividad hepática de ferroquelatasa y si bien provocó una ligera disminución en la actividad de protoporfirinógeno oxidasa esta inhibición no alcanza para explicar la gran acumulación de porfirinas inducida por el antineoplásico.

Hamilton y col. (162), trabajando con hepatocitos de pollo *in vivo* y en cultivo primario, propusieron que las drogas porfirinogénicas podrían estimular la transcripción del mRNA para ALA-sintasa por mecanismos independientes del hemo. Estos autores encontraron que las transcripciones de ALA sintasa y citocromo P450 2C6 eran simultáneamente inducidas por drogas del tipo fenobarbital. Los estudios realizados en el presente trabajo sobre la cinética de inducción del contenido de citocromo P450 después del tratamiento de los embriones de pollo con ciclofosfamida o fenobarbital fueron similares. Esto podría sugerir un mecanismo para la acción porfirinogénica de ciclofosfamida en el embrión de pollo similar a otras drogas tipo fenobarbital.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo de Tesis se estudió la problemática Porfiria-Cáncer desde tres perspectivas distintas. Por un lado, se trató de determinar si existía alguna relación entre la presencia de tumores y el desencadenamiento de porfiria. Por otro lado, y atendiendo al creciente interés que despiertan las porfirinas en la terapia del cáncer, se analizó la eficiencia de uroporfirina I como localizante de tumores. Considerando que la exposición a fármacos es la causa más frecuente de la conversión de porfiria latente en sintomática o de la exacerbación de la enfermedad, llegando en algunos casos a provocar la muerte del paciente y que aún no se habían encarado suficientes estudios para evaluar qué agentes quimioterapéuticos podían administrarse a pacientes que sufrieran ambas enfermedades: porfiria y cáncer, en una última etapa, se decidió estudiar la capacidad porfirinogénica de varios antineoplásicos utilizados habitualmente en el tratamiento de distintos cánceres.

Los estudios realizados con las ratas portadoras de tumores mamarios inducidos por NMU y con las ratas portadoras de tumores hepáticos inducidos por DENA demostraron que:

a) Las ratas portadoras de tumores presentan varios parámetros de la biosíntesis del hemo iguales que los animales normales (excreción urinaria de porfirinas y precursores, contenido de porfirinas hepáticas y actividades de ALA-sintasa y PCL hepáticas). En las ratas portadoras de tumores hepáticos se encontró una actividad anormal de PBG-deaminasa eritrocitaria pero este hecho no tuvo correlación con el desarrollo de tumores. Asimismo en estos animales se observó una actividad de ferroquelatasa hepática menor que la normal pero esta menor actividad no promovió la desregulación del camino metabólico del hemo.

b) Al igual que las ratas normales, las ratas hembras portadoras de tumores hepáticos son más susceptibles a la porfirinogenicidad del HCB que las ratas machos.

c) La presencia de tumores es capaz de modificar la respuesta de los animales al HCB. En el caso de los tumores mamarios, ejerciendo un efecto sinérgico que se evidenció por un aumento en el contenido de porfirinas, en la inducción de la actividad de ALA-sintasa y en la inhibición de la actividad de PCL. En el caso de los tumores hepáticos, los animales portadores de tumores mostraron menor inducción e inhibición de las actividades de ALA-sintasa

y PCL respectivamente aunque acumularon más porfirinas que los animales no portadores.

d) El camino metabólico del hemo es funcional en ambos tipos de tumores pero los mismos son pobremente afectados por el HCB.

Los conocimientos acerca del camino metabólico del hemo en tumores y en animales portadores son aún fragmentarios. Los resultados presentados en este trabajo no sólo representan un valioso aporte al conocimiento del metabolismo de porfirinas en tumores y en los animales huéspedes sino que además demuestran que los animales portadores de diferentes tumores pueden seguir distintas alternativas en cuanto a la susceptibilidad de adquirir porfiria. En los modelos estudiados no pudo establecerse una relación causal entre la presencia de tumores y el desarrollo de porfiria. Sin embargo, para poder asegurar o descartar la hipótesis de una estrecha relación entre ambas enfermedades deben estudiarse una gran variedad de modelos experimentales, esto es, diferentes tumores, diferentes drogas porfirinogénicas y distintas secuencias de eventos.

Los resultados obtenidos al estudiar la captación tumoral y tisular de uroporfirina I y de HPD permitieron concluir que uroporfirina I sería un mejor localizante de tumores que HPD, considerando las concentraciones de ambos compuestos en hígado, pulmón y piel, la relación tumor/piel y la dispersión de los datos. Asimismo se determinó que para encarar una terapia fotodinámica en el modelo utilizado la exposición a la luz debería hacerse a las 4 horas posteriores a la administración intraperitoneal de la porfirina.

Actualmente, la terapia fotodinámica está siendo evaluada en muchos centros de investigación en todo el mundo tanto para su uso en diagnosis como para el tratamiento de neoplasias. Sin embargo, sólo intensificando los estudios con una gran variedad de distintos sensibilizantes se podrán clarificar muchas de las preguntas aún no contestadas así como estimular nuevos caminos de investigación. Considerando las ventajas que presenta uroporfirina I de poseer una composición química definida y los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, este compuesto merecería ser tenido en cuenta en futuros estudios de sensibilización.

Los estudios realizados para investigar la porfirinogenicidad de los distintos antineoplásicos aquí ensayados y comunmente empleados para el tratamiento de enfermedades tales como mieloma múltiple, carcinoma de mama y ovario, linfoma de Hodgkin, adenocarcinomas gastrointestinales y leucemia linfocítica crónica, permitieron determinar que:

a) Dentro del grupo de antineoplásicos alquilantes clásicos, ciclofosfamida y busulfano deberían ser evitados en el tratamiento de neoplasias en personas porfíricas o predispuestas a esta enfermedad, presentando ciclofosfamida una porfirinogenicidad en el embrión de pollo similar a la de AIA, droga considerada de alta capacidad porfirinogénica. Por otro lado, clorambucilo y melfalan no mostraron ser porfirinogénicos en el embrión de pollo.

b) Dentro del grupo de los agentes alquilantes no clásicos, procarbazona y hexametilmelamina son potencialmente riesgosos y no deberían utilizarse en casos de porfiria declarada o latente. El restante agente alquilante no clásico ensayado, dacarbazina, no resultó ser porfirinogénico.

c) Tanto azatioprina como fluorouracilo, antimetabolito de purina y antagonista de pirimidina respectivamente, son porfirinogénicos en el embrión de pollo y por lo tanto deberían ser evitados en el tratamiento de pacientes porfíricos o con predisposición a adquirir porfiria.

Del estudio de la relación estructura-función surgió que la presencia, en la estructura del antineoplásico, del grupo mostaza (grupo directamente involucrado en la actividad antitumoral de clorambucilo, melfalan y ciclofosfamida) no sería responsable de la actividad porfirinogénica de ciclofosfamida.

Por último, los resultados obtenidos al investigar el mecanismo de acción porfirinogénica de ciclofosfamida, permitieron concluir que:

a) El inhibir o inducir la metabolización de ciclofosfamida por el citocromo P450 no ejerce efecto sobre su capacidad porfirinogénica y que su metabolito, acroleína, no es el responsable de dicha capacidad.

b) Su mecanismo de acción no involucra inhibiciones importantes de ferroquelatasa o protoporfirinógeno oxidasa.

c) Ciclofosfamida es un potente inductor del citocromo P450, presentando una cinética de inducción similar al fenobarbital. Estos resultados sugieren un mecanismo de acción porfirinogénica de ciclofosfamida en el embrión de pollo similar a otras drogas tipo fenobarbital para las cuales está propuesto que se podría estar estimulando la transcripción del mRNA para ALA-sintasa por mecanismos independientes de hemo.

Si bien no es posible hacer una extrapolación directa entre los resultados obtenido con un modelo animal experimental y el ser humano, es comunmente admitido que las drogas que manifiestan ser porfirinogénicas en animales son consideradas como drogas prohibidas para los porfiricos declarados o portadores del defecto genético a menos que hubiera suficiente experiencia clínica que indicara que la droga hubiese sido utilizada sin problemas en individuos con porfiria. Por ello, los resultados obtenidos con el estudio de la porfirinogenicidad de antineoplásicos constituyen datos de referencia imprescindibles para los médicos que deban tratar pacientes con porfiria y cáncer.

REFERENCIAS

1. J. G. Straka, J. M. Rank y J.R. Bloomer (1990) *Annu. Rev. Med.* **41**: 457
2. G. Kikuchi, A. Kumar, P. Talmage y D. Shemin (1958) *J. Biol. Chem.* **233**: 1214
3. K.D.Gibson, W.G. Laver y A. Neuberger (1958) *Biochem. J.* **70**: 71
4. S. Granick (1966) *J. Biol. Chem.* **241**:1359
5. S.Granick y G. Urata (1963) *J. Biol. Chem.* **238**: 821
6. H. S. Marver, D. Tschudy, M. Pelroth y A. Collins (1966) *J. Biol. Chem.* **241**:2803
7. F. Takaku, O. Wada, S. Sassa y K. Nakao (1968) *Cancer Res.* **28**: 1250
8. F. L. Margolis (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* **145**: 373
9. J. R. Paterniti, J.J. Simone, D.S. Beattie (1978) *Arch. Biochem. Biophys.* **189**: 86
10. L. B. Bratisten y C.F. Wilkinson (1975) *Biochem. J.* **150**: 97
11. Z. Zaman, P.M. Jordan y M. Akhtar (1973) *Biochem. J.* **135**: 257
12. B. K. May, I.A. Borthwick, G. Srivastava, B.A. Pirola y W.H. Elliot (1986) *Current topics in cellular regulation* **28**: 233
13. G. Srivastava, I.A. Borthwick, D.J. Maquire, C.J. Elferink, M.J. Bawden, J.F. Mercer y B.K. May (1988) *J. Biol. Chem.* **263**: 5202
14. H. Fujita, A. Koizumi, M. Yamamoto, M. Kumai, T. Sadamoto y M. Ikeda (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **800**:1
15. R. Hoffman, N. Ibrahim, M.J. Murmame, A. Diamond, B.G. Forget y R.D. Levere (1980) *Blood* **56**:567
16. N. Watanabe, N. Hayashi y G. Kikuchi (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**:377
17. D. F. Bishop, H. Kitchen y W.A. Wood (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **206**:380
18. M. Yamamoto, H. Fujita, N. Watanabe, N. Hayashi y G. Kikuchi (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **245**:76
19. M. Yamamoto, N.S. Yew, M. Federspiel, J. B. Dodgson, N. Hayashi y J.D. Engel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:3702
20. Riddle, M. Yamamoto y J.D. Engel (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:792
21. K. Yomogida, M. Yamamoto, T. Yamagani, H. Fujita y N. Hayashi (1993) *J. Biochem.* **113**: 364
22. D. F. Bishop, A.S. Henderson y K.H. Astrin (1990) *Genomics* **7**:207
23. H. Fujita, M. Yamamoto, T. Yamagami, N. Hayashi y S. Sassa (1991) *J. Biol. Chem.* **266**:17494

24. M. J. Whiting y W.H. Elliot (1972) *J. Biol. Chem.* **247**:6818
25. R. Barnes, M.S. Jones, O.T.G. Jones y R.J. Porra (1971) *Biochem. J.* **124**: 633
26. I. A. Borthwick, G. Srivastava, J.D. Brooker, B.K. May y W.H. Elliot (1983) *Eur. J. Biochem.* **129**: 615
27. G. Srivastava, I. A. Borthwick, J.D. Brooker, B.K. May y W.H. Elliot (1982) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**: 305
28. M. Nakakumi, K. Yamauchi, N. Hayashi y G. Kikuchi (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 1738
29. H. Kaplan (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **235**: 381
30. Y. Aoki, O. Wada, G. Urata, F. Takaku y K. Nakao (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **42**: 568
31. P.L. Scholnick, L.E. Hammaker y H.S. Marver (1972) *J. Biol. Chem.* **247**: 4126
32. J.S. Woods y V.V. Murtly (1975) *Mol. Pharmacol.* **11**: 70
33. J. R. Paterniti y D.S. Beatti (1979) *J. Biol. Chem.* **254**: 6112
34. M.J. Whiting y S. Granick (1976) *J. Biol. Chem.* **251**: 1340
35. J.S. Woods (1974) *Mol. Pharmacol.* **10**: 389
36. D.P. Tschudy, H.S. Marver y A. Collins (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **21**: 480
37. S. Sassa y S. Granick (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**: 517
38. A. Kappas, S. Sassa y K.E. Anderson (1982) en "The metabolic basis of inherited diseases" (Ed. Stanbury, J.B., Wyngaarden, J. B., Fredrickson, D. S., Goldstein, J.L., Brown, M.S.) Cap. 60, pp. 1301-1384.
39. I. Schröder, L. Hederstedt, C. Kannangara y S.P. Gough (1992) *Biochem. J.* **281**: 843
40. M. E. Lombardo, L. S. Araujo, A. A. Juknat y A. M. del C. Battle (1989) *Eur. J. Biochem.* **182**: 657
41. C. E. McKinney e I. Z. Ades (1991) *Int. J. Biochem.* **23**: 803
42. K.D. Gibson, A. Neuberger y J.J. Scott (1955) *Biochem. J.* **61**: 618
43. S. Granick (1954) *Science* **120**: 1105
44. B.F. Burnham y J. Lascelles (1963) *Biochem. J.* **87**: 462
45. D.L. Nandi y D. Shemin (1968) *J. Biol. Chem.* **243**: 1236
46. P.M. Jordan y J.S. Seehra (1980) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, p240
47. A. Battle y A.M. Stella (1978) *Int. J. Biochem.* **9**: 861
48. V.N. Finelli, D.S. Klauder, M.A. Karaffa y H.G. Petering (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**: 303
49. A. Cheh y J.B. Neilands (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**: 1060
50. I. Tsukamoto, T. Yoshinaga y S. Sano (1979) *Biochem. Biophys. Acta* **570**: 167

51. L.W. Mitchell y E. K. Jaffe (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 169
52. W.H. Wu, D. Shemin, K.E. Richards y R. Williams (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1767
53. P.N. Gibbs, A.G. Chaudhry y P.M. Jordan (1985) *Biochem. J.* **230**: 25
54. J.L. Granick, S. Sassa, S. Granick, R.D. Levere y A. Kappas (1973) *Biochem. Med.* **8**: 149
55. S. Beale (1970) *Plant Physiol.* **45**: 505
56. J.B. Weissberg y P.E. Voytek (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **364**: 304
57. B. Lindblad, S. Lindsteadt y G. Steen (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 4641
58. T.R. Bishop, L.P. Frelin y S.H. Boyer (1990) *Genomics* **7**: 629
59. P.M. Jordan y A. Berry (1981) *Biochem. J.* **195**: 177
60. P.M. Anderson y R.J. Desnick (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 1993
61. H.A. Sancovich, A.M. del C. Batlle y M. Grinstein (1969) *Biochim. Biophys. Acta* **158**: 79
62. M.B. Mazzetti y J. M. Tonio (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **957**: 97
63. M. Higuchi y L. Bogorad (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **244**: 401
64. C. Beaumont, C. Porcher, C. Picat, Y. Nordman y B. Grandchamp (1989) *J. Biol. Chem.* **264**: 14829
65. S. F. Tsai, D.F. Bishop y R.J. Desnick (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 1268
66. G.J. Hart y A.R. Battersby (1985) *Biochem. J.* **232**: 151
67. E.S. Smythe y D.C. Williams (1988) *Biochem. J.* **253**: 275
68. A.F. Alwan, B.I.A. Mgbeje y P.M. Jordan (1989) *Biochem. J.* **264**: 397
69. P.M. Jordan, G. Burton, H. Nordlov, M.M. Schneider, L. Pryde y A.I. Scott (1979) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 204-205
70. R. Battersby, J. R. Fookes, G. W. J. Matcham, E. McDonald y K. E. Gustafson-Potter (1979) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 316-319
71. N. S. Evans, G. Burton, P. E. Fagerness, N. Mackenzie y A. I. Scott (1986) *Biochemistry* **25**: 905
72. Rosé, R. B. Frydman, C. de los Santos, A. Sburlati, A. Valasinas y B. Frydman (1988) *Biochemistry* **27**: 4871
73. M. Jordan y M. J. Warren (1987) *FEBS Lett.* **255**: 87
74. J. Hart, A. D. Miller y A. R. Battersby (1988) *Biochem. J.* **252**: 909
75. C. Woodcock y P. M. Jordan (1994) *Biochemistry* **33**: 2688
76. D. Mauzerall y S. Granick (1958) *J. Biol. Chem.* **232**: 1141
77. J.M. Tomio, R. G. García, L.C. San Martín de Viale y M. Grinstein (1970) *Biochem. Biophys. Acta* **198**: 353

78. A.H. Jackson, H.A. Sancovich, A.M. Ferramola, N. Evans, D.F. Games, S.A. Matlin, G.H. Elder y S.G. Smith (1976) *Philos. Trans. R. Soc. London B* **273**:191
79. L. Bogorad (1955) *Science* **12**: 1878
80. A. G. Smith y J.E. Francis (1979) *Biochem. J.* **183**: 455
81. L. C. San Martín de Viale, A. Aragonés y J.M. Tomio (1976) *Acta Physiol. Latinoam.* **26**: 403
82. G. Romeo y E.Y. Levin (1971) *Biochem. Biophys. Acta* **230**: 330
83. J.P. Kushner, D.P. Steinmuller y G.R. Lee (1975) *J. Clin. Invest.* **56**: 661
84. J. Luo y C.K. Lim (1993) *Biochem. J.* **289**: 529
85. L. C. San Martín de Viale, R.C. García, D. Kleiman de Pisarev, J.M. Tomio y M. Grinstein (1969) *FEBS Lett.* **5**: 145
86. R. C. García, L. C. San Martín de Viale, J.M. Tomio y M. Grinstein (1973) *Biochem. Biophys. Acta* **309**: 203
87. G.E. Koopmann, A.A. Juknat de Geralnick y A. M. del C. Batlle (1986) *Int. J. Biochem.* **18**: 935
88. H. de Verneuil, S. Sassa y A. Kappas (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 2454
89. J.G. Straka y J.P. Kushner (1983) *Biochemistry* **22**: 4664
90. S. Kawanishi, S. Seki y S. Sano (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 4285
91. D.S. Hoare y H. Heath (1959) *Biochem. J.* **73**: 679
92. T.C. Cheng y G.W. Miller (1974) *Plant Cell Physiol.* **15**: 993
93. M. del C. Ríos de Molina, S.C. Billi, R. Wainstok de Calmanovici y L. C. San Martín de Viale (1984) *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* **34**: 393
94. M. del C. Ríos de Molina, R. Wainstok de Calmanovici y L.C. San Martín de Viale (1987) *Int. J. Biochem.* **19**: 365
95. G.H. Elder y A. J. Urquhart (1984) *Biochem. Soc. Trans.* **12**: 663
96. H. de Verneuil, B. Grandchamp y Y. Nordmann (1980) *Biochem. Biophys. Acta* **661**: 174
97. A. Chelstowska, T. Zoladek, J. Garey, J. Kushner, J. Rytka y R. Labbe-Bois (1992) *Biochem. J.* **288**: 753
98. P.H. Romeo, N. Raich, A. Dubart, D. Beaupain, M. Pryor, J. Kushner, M. Cohen-Solal y M. Goossens (1986) *J. Biol. Chem.* **261**: 9825
99. S. Billi de Catabbi, M. del C. Ríos de Molina y L. C. San Martín de Viale (1991) *Int. J. Biochem.* **23**: 675
100. Billi de Catabbi y L. C. San Martín de Viale (1994) *Int. J. Biochem.* **26**: 595
101. A. Dubart, M.G. Mattei, N. Raich, D. Beaupain, P.H. Romeo, J.F. Mattei y M. Goossens (1986) *Hum. Genet.* **73**: 277
102. Sano y S. Granick (1961) *J. Biol. Chem.* **236**: 1173

103. A.H. Jackson, G.H. Elder y S.G. Smith (1978) *Int. J. Biochem.* **9**: 877
104. C. Rimington (1989) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **27**: 473
105. A.M del C. Batlle, A. Benson y C. Rimington (1965) *Biochem. J.* **97**: 731
106. R.J. Porra y J.E. Falk (1964) *Biochem. J.* **90**: 69
107. B. Grandchamp, L. Phung e Y. Nordmann (1978) *Biochem. J.* **176**: 97
108. G.H. Elder y J.O. Evans (1978) *Biochem. J.* **172**: 345
109. T. Yoshinaga y S. Sano (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 4722
110. J.M. Camadro, H. Chambon, J. Jolles y P. Labbe (1986) *Eur. J. Biochem.* **156**: 579
111. M. Zagorec, J.M. Buhler, I. Treich, T. Keng, L. Guarente y R. Labbe-Bois (1988) *J. Biol. Chem.* **263**: 9718
112. S.A. Coomber, R.M. Jones, P.M. Jordan y C.N. Hunter (1992) *Mol. Microbiol.* **6**: 3159
113. L.C. Gibson, P. McGlynn, M. Chaudhri y C.N. Hunter (1992) *Mol. Microbiol.* **6**: 3171
114. H. Kohno, T. Furukawa, T. Yoshinaga, R. Tokunaga y S. Taketani (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 21359
115. S. Taketani, H. Kohno, T. Furukawa, T. Yoshinaga y R. Tokunaga (1994) *Biochim. Biophys. Acta B* **1183**: 547
116. Matringe, J.M. Camadro, M.A. Block, J. Joyard, R. Scalla, P. Labbe y R. Douce (1992) *J. Biol. Chem.* **267**: 4646
117. A. H. Jackson, D.E. Games, P. Couch, J.R. Jackson, R.B. Belcher y S.G. Smith (1974) *Enzyme* **17**: 81
118. S.G. Smith, A.H. Jackson y J.R. Jackson (1976) *Ann. Clin. Res.* **8**: 53
119. R. Poulson y W.J. Polglase (1975) *J. Biol. Chem.* **250**: 1269
120. R. Poulson (1976) *J. Biol. Chem.* **251**: 3730
121. J. Kolarov, B.D. Nelson y S. Kuzela (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **116**: 2
122. R. Poulson y W.J. Polglase (1974) *FEBS Lett.* **40**: 258
123. J. C. Deybach, V. Da Silva, B. Grandchamp y I. Nordmann (1985) *Eur. J. Biochem.* **149**: 431
124. J.M. Jacobs y N.J. Jacobs (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* **229**: 312
125. A. Sasarman, J. Letowski, G. Czaika, V. Ramirez, M. A. Nead, J. M. Jacobs y R. Morais (1993) *Can. J. Microbiol.* **39**: 1155
126. M.S. Jones y O.T.G. Jones (1969) *Biochem. J.* **113**: 507
127. H. A. Dailey (1982) *J. Biol. Chem.* **257**: 14714
128. B.M. Harbin y H.A. Dailey (1985) *Biochemistry* **24**: 366
129. H.A. Dailey (1985) *Biochemistry* **24**: 1287
130. H.A. Dailey y J.E. Fleming (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 11453

131. S. Taketani y R. Tokunaga (1981) *J. Biol. Chem.* **256**: 12748
132. H.A. Dailey, C.S. Jones y S. Karr (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **999**: 7
133. J.W. Hanson y H.A. Dailey (1984) *Biochem. J.* **222**: 695
134. R. Labbe-Bois (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 7278
135. M. Mathews-Roth, G.L. Drouin y L. Duffy (1987) *Arch. Dermatol.* **123**: 429
136. D. Brenner y F. Frasier (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 849
137. Y. Nakahashi, S. Taketani, M. Okuda, K. Inoue y R. Tokunaga (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**: 748
138. S. Taketani, J. Inazawa, Y. Nakahashi, T. Abe y R. Tokunaga (1992) *Eur. J. Biochem.* **205**: 217
139. S. Taketani y R. Tokunaga (1982) *J. Biochem. (Tokyo)* **127**: 443
140. J.G. Straka, J.R. Bloomer y E.S. Kempner (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 24637
141. H.A. Dailey, J.E. Fleming y B.M. Harbin (1986) *Methods Enzymol.* **123**: 401
142. M. del C. Ríos de Molina, S. Billi de Catabbi y L. C. San Martín de Viale (1991) *Int. J. Biochem.* **23**: 669
143. A. Abbas y R. Labbe-Bois (1993) *J. Biol. Chem.* **268**: 8541
144. H.A. Dailey y A. Smith (1984) *Biochem. J.* **223**: 441
145. R.F. Labbe y N. Hubbard (1961) *Biochim. Biophys Acta* **52**: 130
146. F. De Matteis (1988) *Sem. Hematol.* **25**: 321
147. F.P. Guengerich (1989) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **29**: 261
148. T.D. Porter y M.J. Coon (1991) *J. Biol. Chem.* **266**: 13469
149. W.B. Jakoby y D.M. Ziegler (1990) *J. Biol. Chem.* **265**: 20715
150. D.W. Nebert, D.R. Nelson, M.J. Coon, R.W. Estabrook, R. Feyereisen, Y. Fujii-Kuriyama, F.J. Gonzalez, F.P. Guengerich, I. Gunsalus, E.F. Johnson, J.C. Loper, R. Sato, M.R. Waterman y D.J. Waxman (1991) *DNA Cell Biol.* **10**: 1
151. Ioannides (1990) *Biochem. Soc. Trans.* **18**: 32
152. P.E. Thomas, R.E. Kouri y J. Hutton (1972) *Biochem. Genet.* **6**: 157
153. G.S. Marks, S.A. McCluskey, J.E. Mackie, D.S. Riddick y C.A. James (1988) *FASEB J.* **2**: 2774
154. G. Smith y F. De Matteis (1980) *Clin. Haematol.* **9**: 399
155. L. Scholnick, L. E. Hammaker y H. S. Marver (1972) *J. Biol. Chem.* **247**: 4132
156. Watanabe, N. Hayashi y G. Kikuchi (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**: 377
157. G. Srivastava, J.D. Brooker, B.K. May y W.H. Elliot (1980) *Biochem. J.* **188**: 781
158. M.J. Whiting (1976) *Biochem. J.* **158**: 391
159. J.D. Brooker, B.K. May y W.H. Elliot (1980) *Eur. J. Biochem.* **106**: 17

160. M. Yamamoto, N. Hayashi y G. Kikuchi (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **115**: 225
161. K. Yamauchi, K. Hayashi y G. Kikuchi (1980) *J. Biol. Chem.* **255**: 1746
162. J.W. Hamilton, W.J. Bement, P.R. Sinclair, J.F. Sinclair y K.E. Wetterhahn (1988) *Biochem. J.* **255**: 267
163. G. Ryan e I.Z. Ades (1989) *Int. J. Biochem.* **21**: 1025
164. P.D. Drew e I.Z. Ades (1990) *Int. J. Biochem.* **22**: 607
165. C. Dogra, C. N. Hahn y B. K. May (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 531
166. M.R. Moore (1993) *Int. J. Biochem.* **25**: 1353
167. R. Schmid, S. Schwartz y C.J. Watson (1954) *Arch. Int. Med* **93**:167
168. C. R. Morris y J.R.P. Cabral (1986) Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium in Lyon, IARC Scientific Publications N° 77, Lyon and Oxford University Press, pp. 3-651
169. K. O'Reilly, J. Snape y M.R. Moore (1988) *Clin. Exp. Dermat.* **13**: 44
170. M. A. Aziz, S. Schwartz y C.J. Watson (1964) *J. Lab. Clin. Med.* **63**: 596
171. S. Sassa y A. Kappas (1983) *J. Clin. Invest.* **71**: 625
172. S. Sassa, H. Fujita y A. Kappas (1990) *Pediatrics* **86**: 84
173. K. E. Anderson, D. E. Goeger, R. W. Carson, S.K. Lee y R. B. Stead (1990) *N. Engl. J. Med.* **322**: 315
174. L. Torok (1976) *Z. Hautkr.* **51**: 397
175. A. B. Rifkind (1976) *Primary Care* **3**: 665
176. F. De Matteis (1973) *Enzyme* **16**: 266
177. F. De Matteis, G. Abritti y A.H. Gibbs (1973) *Biochem. J.* **134**: 717
178. A. B. Rifkind (1979) *J. Biol. Chem.* **254**: 4636
179. A.M. Brady y E. A. Lock (1992) *Arch. Toxicol.* **66**: 175
180. P.R. Ortiz de Montellano, H. S. Beilan y K. L. Kunze (1981) *J. Biol. Chem.* **256**: 6708
181. G. Marks, D.T. Allen, C. T. Johnston, E.P. Sutherland, K. Nakatsu y R. A. Whitney (1985) *Mol. Pharmacol.* **27**: 459
182. S. P. C. Cole y G. S. Marks (1984) *Mol. Cell Biochem.* **64**: 127
183. J.E. Mackie y G.S. Marks (1989) *Biochem. Pharmacol.* **38**: 2169
184. K.E. Anderson (1978) *Biochim. Biophys. Acta* **543**: 313
185. J. Ch. Deybach, V. Da Silva, L.N. Phung, J.C. Levy e Y. Nordmann (1987) *Presse Méd.* **16**: 68
186. C.J. Morgan y A. A-B Badawy (1992) *Biochem. Pharmacol.* **43**: 1473
187. R. Schmid y S. Schwartz (1952) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **81**: 685
188. A. Goldberg y C. Rimington (1955) *Proc. Roy. Soc. B* **143**: 257

189. P.R. Ortiz de Montellano, G.S. Yost, B.A. Mico, S.E. Dinizo, M.A. Correia y H. Kumbara (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* **197**: 524
190. F. De Matteis (1971) *Biochem. J.* **124**: 767
191. W. Levin, M. Jacobson, E. Sernatinger y R. Kuntzman (1973) *Drug. Metab. Disp.* **1**: 275
192. P.R. Ortiz de Montellano y B.A. Mico (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **206**: 43
193. P.R. Ortiz de Montellano, B.A. Mico, J.M. Mathews, K.L. Kunze, G.T. Miwa y A.Y.H. Lu (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **210**: 717
194. L.M. Bornheim, M.C. Underwood, P. Caldera, A.E. Rettie, W.F. Trager, S.A. Wrighton y M.A. Correia (1987) *Mol. Pharmacol.* **32**: 299
195. M.A. Correia, K. Yao, S.A. Wrighton, D.J. Waxman y A.E. Rettie (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **291**: 493
196. J.D. Brooker y R. O'Connor (1982) *Eur. J. Biochem.* **129**: 325
197. J.D. Brooker, G. Srivastava, I.A. Borthwick, G.K. May y W.H. Elliot (1983) *Eur. J. Biochem.* **136**: 327
198. V.J. Dwarki, V.N.K. Francis, G.J. Bhat y G. Padmanaban (1987) *J. Biol. Chem.* **262**: 16958
199. D.J. Cripps, H.A. Peters, A. Goomen e I. Dogramaci (1984) *Brit. J. Dermatol.* **111**: 413
200. J.O. Grimalt, J. Sunyer, V. Moreno, O.C. Amaral, M. Sala, A. Rosell, J.M. Anto y J. Albaiges (1994) *Int. J. Cancer* **56**: 200
201. R. Wainstok de Calmanovici, M. del C. Rios de Molina, M. C. Taira de Yamasato, J. M. Tomio y L. C. San Martín de Viale (1984) *Biochem. J.* **218**: 753
202. L. C. San Martín de Viale, S. Nacht y M. Grinstein (1970) *Clin. Chim. Acta* **28**: 13
203. L. C. San Martín de Viale, M. del C. Rios de Molina, R. Wainstok de Calmanovici y J. M. Tomio (1977) *Biochem. J.* **168**: 393
204. G. H. Elder, C. O. Evans y S. A. Matlin (1976) *Clin. Sci. Mol. Med.* **51**: 71
205. C. Rajamanickam, J. Amrutevalli, M.R.S. Rao y G. Padmanaban (1972) *Biochem. J.* **129**: 381
206. A. G. Smith, J. E. Francis, J. A. Guen, J.B. Greig, C.R. Wolf y M.M. Manson (1990) *Biochem. Pharmacol.* **40**: 2059
207. A.G. Smith, J.R.P. Cabral y F. De Matteis (1979) *Chem. Biol. Interact.* **27**: 353

208. R. Wainstok de Calmanovici, S. C. Billi de Catabbi, C.A. Aldonatti y L.C. San Martín de Viale (1989) *Int. J. Biochem.* **21**: 377
209. A. G. Smith y J.E. Francis (1987) *Biochem. J.* **214**: 909
210. J.J.F. Taljaard, B.C. Shanley, W.M. Deppe y S.M. Joubert (1972) *Br. J. Haemat.* **23**: 513
211. R. Wainstok de Calmanovici, S.C. Billi, C.A. Aldonatti y L.C. San Martín de Viale (1986) *Biochem. Pharmac.* **35**: 2399
212. H. Merk, A. von Zittwitz, K. Bolsen y G. Goerz (1985) *Arzneimittel-Forsch* **35**: 1685
213. G. Koss, W. Koransky y K. Steinbach (1976) *Arch. Toxicol.* **35**: 107
214. H. Lui, R. Sampson y G.D. Sweeney (1976) En: *Porphyria in Human Diseases* (M. Doss, ed.) Karger Basel, Switzerland, pp 405-413
215. R. Wainstok de Calmanovici y L. C. San Martín de Viale (1980) *Int. J. Biochem.* **12**: 1039
216. S. C. Billi, G. Koss y L. C. San Martín de Viale (1986) *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmac.* **51**: 325
217. M.A. Alleman, J.F. Koster, J.H.P. Wilson, A. Edixhoven-Bosdijk, R.G. Slee, M.J. Kroos y H.G. van Eijk (1985) *Biochem. Pharmac.* **34**: 161
218. O. Viser, J.W.O. van den Berg, A. Edixhoven-Bosdijk, R. Koole-Lesuis, T. Rietveld y J.H.P. Wilson (1989) *Fd. Chem. Toxic.* **27**: 317
219. P. Sinclair, R. Lambrecht y J. Sinclair (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**: 1324
220. H.L. Bonkovsky (1989) *Hepatology* **10**: 354
221. R.W. Lambrecht, J.M. Jacobs, P.R. Sinclair y J.F. Sinclair (1990) *Biochem. J.* **269**: 437
222. C. Ríos de Molina, R. Wainstok de Calmanovici y L. C. San Martín de Viale (1980) *Int. J. Biochem.* **12**: 1027
223. S. C. Billi, R. Wainstok de Calmanovici y L. C. San Martín de Viale (1986) *Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium in Lyon, IARC Scientific Publications N° 77, Lyon and Oxford University Press*, pp. 487-491
224. L. Cantoni, D. Dal Fiume, M. Rizzardini y R. Ruggieri (1984) *Toxicol. Lett.* **20**: 211
225. A. G. Smith y J.E. Francis (1987) *Biochem. J.* **246**: 221
226. Tio, B. Leijnse, A. Jarret y C. Rimington (1957) *Clin. Sci.* **16**: 517

227. R. P. H. Thompson, D. C. Nicholson, T. Farnan, N. Whitmore y R. Williams (1970) *Gastroenterology* **59**: 779
228. M. Udagawa, Y. Horie y C. Hirayama (1984) *Biochem. Med.* **31**: 131
229. R. Enriquez de Salamanca, F. Romeo García-Alix, S. Prieto Rodríguez, A. Martín Alonso y M.L. Peña Payero (1979) *Gastroenterología y Hepatología* **2**: 27
230. J. A. Solís, P. Betancor, R. Campos, R. Enriquez de Salamanca, P. Rojo, I. Marin y A. Schüller (1982) *J. Dermatol.* **9**: 131
231. R. Kauppinen y P. Mustajoki (1988) *Br. J. Cancer* **57**: 117
232. J. Gubler y M.J. Bargetzi (1990) *Am. J. Med.* **89**: 540
233. M. M. H. El-Sharabasy, A.M. El-Waseef, M.M. Hafez y S.A. Salim (1992) *Br. J. Cancer* **65**: 409
234. B. Zawirska y W. Bednarsz (1981) *Neoplasma* **28**: 35
235. H. Denk, R. Kalt, M. Abdelfattah-Gad y U. Meyer (1981) *Cancer Res.* **41**: 1535
236. H. L. Bonkowsky, D.P. Tschudy, A. Collins y J.M. Doherty (1973) *J. Natl. Cancer Inst.* **50**: 1215
237. K. Matsuoka (1968) *J. Jpn. Biochem. Soc.* **40**: 59
238. A. G. Smith, J.E. Francis, D. Dinsdale, M.M. Manson y J.R.P. Cabral (1985) *Carcinogenesis* **6**: 631
239. M. Arbus (1981) *Am. J. Hosp. Pharm.* **38**: 631
240. A. Marinello, H. Gurtoo, R. Struck y B. Paul (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **83**: 1347
241. B. Chabner (1982) *Pharmacologic Principles of Cancer Treatment*. (Ed. B. Chabner) W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 1-457
242. R. Kyle y W. Dameshek (1961) *Blood* **23**: 776
243. N. Manzione, A. Wolkoff y S. Sassa (1988) *Gastroenterology* **95**: 1119
244. A.G. Palma-Carlos, M. L. Palma Carlos, M. G. Lourenco y J.A. Martins-Silva (1971) *S. Afr. J. Lab. Clin. Med.* **45**: 81
245. R. Wainstok de Calmanovici y L.C. San Martín de Viale (1988) *Int. J. Biochem.* **20**: 1015
246. M. Rizzardini, A. Ferraroli, D. Dal Fiume y L. Cantoni (1984) *Experientia* **40**: 1390
247. V. T. De Vita, A.A. Serpik y P.P. Carbone (1970) *Ann. Intern. Med.* **73**: 881
248. R. L. Conis (1976) *Cancer Treat. Rep.* **41**: 1680
249. A. Santoro y G. Bonadonna (1979) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2**: 101

250. S. S. Legha, M. Slavik y S.K. Carter (1986) *Cancer* **38**: 27
251. F. Meyer-Betz (1913) *Arch. Dtsch. Klin. Med.* **112**: 476
252. F. Figge (1948) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **68**: 640
253. I. Diamond, A. Mc Donagh y C. Wilson (1972) *Lancet* **2**: 1175
254. M. Manyak, A. Russo, P. Smith y E. Glatstein (1988) *J. Clin. Oncol.* **6**: 390
255. M. Kreimer-Birmbaum (1989) *Sem. Hematol.* **26**: 157
256. J. Moan y T. Christensen (1980) *Tumor Res.* **15**: 1
257. D. Kessel y M.L. Cheng (1985) *Cancer Res.* **45**: 3053
258. T. J. Dougherty (1987) *Photochem. Photobiol.* **45**: 879
259. Y.K. Ho, R.K. Pandey, J.R. Missert y T. J. Dougherty (1990) *Photochem. Photobiol.* **52**: 1085
260. P. Baas, F. Hartjes, T. Loopik, H. Oppelaar, G. Sutedja y N. van Zandwijk (1993) *Lassers Med. Sci.* **8**: 93
261. E. J. Land (1984) *Int. J. Radiat. Biol.* **46**: 219
262. J. D. Spikes (1989) Photosensitization. En: *The Science of Photobiology* (Ed. Kendric C. Smith) Plenum Publishing Corporation. pp.81-110
263. J. Moan (1990) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **6**: 343
264. A.W. Girotti (1990) *Photochem. Photobiol.* **51**: 497
265. D. Kessel y C. Erickson (1992) *Photochem. Photobiol.* **55**: 397
266. R. Agarwal, S. I. A. Zaidi, M. Athar, D. Bickers y H. Mukhtar (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **294**: 30.
267. J.P.J. Boegheim, H. Scholte, T.M.A.R. Dubbelman, E. Beems, A.K. Raap y J. Van Steveninck (1987) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1**: 61
268. K. G. Specht y M.A.J. Rodgers (1990) *Photochem. Photobiol.* **51**: 319
269. W.G. Roberts, L.H. Liaw y M.W. Berns (1989) *Lasers Surg. Med.* **9**: 102
270. H.W. Lim, D. Parker y A.J. Marcus (1986) *Clin. Res.* **34**: 763
271. B. W. Henderson y J. M. Donovan (1989) *Cancer Res.* **49**: 6896
272. F. A. Kerdel, N. A. Soter y H.W. Lim (1987) *J. Invest. Derm.* **88**: 277
273. T. Okunaka, H. Kato, C. Konaka, N. Kawate, A. Bonaminio, H. Yamamoto, N. Ikeda, M. Tolentino, M. Eckhauser y Y. Hayata (1991) *Cancer* **68**: 253
274. D. Cortese, J. Kinsey, L. Woolner, W. Spencer Payne, D. Sanderson y R. Fontana (1979) *Mayo Clin. Proc.* **54**: 635
275. J. McCaughan, P. Hawley, B. Bethel y J. Walker (1988) *Cancer* **62**: 691
276. D. Schuller, J. Mc Caughan y R. Rack (1984) *Arch. Otolaryngol.* **111**: 351
277. W. E. Grant, C. Hopper, A.J. MacRobert, P.M. Speight y S. G. Bown (1993) *Lancet* **342**: 147

278. T. Patrice, M. Foultier, S. Yactayo, M. Douet, F. Maloisel y L. LeBodic (1990) *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **6**: 157
279. R. Wooten, D. Ahlquist, R. Anderson, H. Carpenter, J. Pemberton, D. Cortese y D. Ilstrup (1989) *Cancer* **64**: 1569
280. R. Benson, J. Kinsey y D. Cortese (1983) *J. Urol.* **130**: 1090
281. A. M. Abulafi y N.S. Williams (1992) *Br. Med. J* **304**: 589
282. E. Bal de Kier Joffe, L. Puricelli, M. del C. Vidal y E. Lustig, (1983) *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2**:151
283. D. Mauzerall y S. Granik (1956) *J. Biol. Chem.* **219**: 435
284. R. Wainstok de Calmanovici (1982) Porfiria experimental por hexaclorobenceno. Estudios sobre el mecanismo de producción de porfiria. Tesis Doctoral. F.C.E.yN. UBA
285. A. Akhtar, M.M. Abboud, G. Barnard, P.M. Jordan y Z. Zaman (1976) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **273**: 117
286. Rimington y S. L. Sveinsson (1950) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **2**: 209
287. M. El-Far, N. Abd El-Hamid y M. Ghoneim (1988) *Biochimie* **70**: 1379
288. M. Doss (1970) *Z. klin. chem. klin. Biochem.* **8**:197
289. J. Salum, A. M del C. Batlle y M. Grinstein (1961) *Anales Asoc. Quim. Arg.* **49**:3
290. C. R. Magnussen, J. B. Levine, J. M. Doherty, J. O. Cheesman y D. P. Tschudy (1974) *Blood* **44**: 857
291. L. C. San Martín de Viale (1970) Biosíntesis del hemo. Purificación y caracterización de las porfirinas urinarias en porfiria humana y experimental. Porfirinógenos de 5- y 6-COOH (isómero III) como intermediarios normales en la biosíntesis del hemo. Tesis doctoral. FCEyN. UBA
292. H. Fisher y A. Stern (1940) *Die Chemie des Pyrroles, Leipzig*, 2 pt. 2: 420
293. D. A. Brenner y J. R. Bloomer (1980) *Clin. Chim. Acta* **100**: 259
294. R. J. Porra, K. S. Vitols, R. F. Labbe y N. A. Newton (1967) *Biochem. J.* **104**:321
295. J. E. Falk (1964) *Porphyrins and Metalloporphyrins* (Ed. Elsevier Publishing Co.) , Amsterdam, London y New York, pag. 236
296. R.J. Porra y O.T.G. Jones (1963) *Biochem. J.* **87**: 181
297. S. P. C. Cole, E. J. Vavasour y G. S. Marks (1979) *Biochem. Pharmacol.* **28**: 3533
298. T. Omura y R. Sato (1964) *J. Biol. Chem.* **239**: 2370.

299. E. B. Sandell (1959) *Colorimetric Determination of Traces of Metals*. (Eds. B. L. Clarke, P. J. Elving y I. M. Kolthoff) Interscience publishers Inc., New York, pp. 522-554
300. O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall (1951) *J. Biol. Chem.* **193**: 265
301. IARC (1978) *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some N-Nitroso Compounds* **17**: 227.
302. P.M. Gullino, H. Pettigrew y F. Grantham (1975) *J. Natl. Cancer Inst.* **51**: 401
303. L. Turcot-Lemay y P. Kelly (1980) *Cancer Res.* **40**: 3232
304. B.M. Arafah, P.M. Gullino, A. Manni y O.H. Pearson (1980) *Cancer Res.* **40**: 4628
305. E. S. Rivera, N. Andrade, G. Martin, G. Melito, G. Cricco, N. Mohamad, C. Davio, R. Caro y R. M. Bergoc (1994) *Cancer Lett.* **86**: 223
306. N. M. Navone, A. Frisardi, E. Resnik, A. Batlle y C. Polo (1988) *Med. Sci. Res.* **16**: 61
307. M. Navone, C. F. Polo, A. Frisardi y A. M. del C. Batlle (1990) *Int. J. Biochem.* **22**: 1410
308. M. Navone, S. G. Afonso, C. F. Polo y A. M. del C. Batlle (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* **102**: 8792.
309. B. Zawirska (1986) *Bolletino dell Istituto D'ermatologico S. Gallicano* **13**: 41
310. L. Leibovici, N. Schoenfeld, H.A. Yehoshua, R. Mamet, E. Rakowsky, A. Shindel y A. Atsmon (1988) *Cancer* **62**: 2297
311. E. Weisenberg (1986) en: *Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium* (Morris, C.R. y Cabral J.R.P. eds.) IARC Scientific Publications N° 77, Lyon, France, pag. 193.
312. Z. Jemaa, S. Sabbah, M.R. Driss y M.L. Bouguerra (1986) en: *Hexachlorobenzene: Proceedings of an International Symposium* (Morris, C.R. y Cabral J.R.P. eds.) IARC Scientific Publications N° 77, Lyon, France, pag.139.
313. D. L. Stout y F. F. Becker (1987) *Cancer Res.* **47**: 963
314. L. C. San Martín de Viale, M. C. Ruso y M. Grinstein (1968) *Primera Conferencia Latinoamericana de Bioquímica Clínica* **1**: 168
315. H. Ippen y D. Aust (1972) *Klin. Wschr.* **50**: 793

316. L. C. San Martín de Viale, J. M. Tomio, A.M. Ferramola, H.A. Sancovich y H.A. Tigier (1976) *First Int. Porphyrin Meet.: Porphyrins in Human Diseases* (M. Doss, Ed.), S. Karger-Basel, pag. 453.
317. F. Welland, E. Hellman, A. Collins, G. Hunter y D. Tschudy (1964) *Metabolism* **13**: 251
318. F. T. Becker (1965) *Arch. Dermat.* **92**: 252
319. G. Coluccia, G. Martin, G. Melito, S. Malkischer, N. Mohamad, E. Rivera, R. Bergoc y R. Caro (1989) *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **23**: 375
320. M. Worwood (1977) en: *Iron Excess. Aberrations of iron and porphyrin metabolism.* (Muller-Eberhard, N., Miescher, P. y Jaffé, E.R. Eds.) Grune y Stratton, New York, pag. 3.
321. F. De Matteis y M. Stonard (1977) *Semin. Hematol.* **14**: 187
322. H. Sinclair y S. Granick (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **61**: 124
323. G. D. Sweeney (1986) *Clin. Biochem.* **19**: 3
324. A. G. Smith y J. E. Francis (1983) *Biochem. J.* **214**: 909
325. W. van Gelder, P.D. Siersema, A. Voogd, N.C.M. de Jeu-Jaspars, H.G. van Eijk, J. F. Koster, F. W. M. de Rooy y J. H. P. Wilson (1993) *Biochem. Pharmacol.* **46**: 221
326. G. Smith, P. Carthew, J. E. Francis, J.R.P. Cabral y M. Manson (1993) *Carcinogenesis* **14**: 1381
327. J.E. Francis y A. G. Smith (1987) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **146**: 13
328. D. M. Miller y J. Woods (1993) *Biochem. Pharmacol.* **46**: 2235
329. IARC (1978) *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some N-nitroso compound.* **17**: 83-124.
330. M. D. Reubery C.W. Lee (1968) *J. Natl. Cancer Inst.* **41**: 1133
331. O. Epstein, M. Lahav, N. Schoenfeld, L. Nemesh, N. Shaklai y A. Atsmon (1983) *Cancer* **52**: 828
332. S. Sassa y S. E. Bernstein (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 1181
333. F. P. Stewart, M.M. Manson, J.R.P. Cabral y A.G. Smith (1989) *Carcinogenesis* **10**: 1225
334. M. Rizzardini y A.G. Smith (1982) *Biochem. Pharmacol.* **31**: 3543
335. S. Sassa (1976) *J. Exp. Med.* **143**: 305
336. D.L. Grant, F. Iverson, G.V. Hatina y D.C. Villeneuve (1974) *Environ. Physiol. Biochem.* **4**: 159
337. J. M. Jacobs, P.R. Sinclair, W.J. Bement, R.W. Lambrecht, J.F. Sinclair y J.A. Goldstein (1989) *Biochem J.* **258**: 247
338. D. L. Stout y F.F. Becker (1986) *Cancer Res.* **46**: 2756

339. A. G. Smith, J. R. P. Cabral, P. Carthew, J. E. Francis y M. M. Manson (1989) *Int. J. Cancer* **43**: 492
340. M. El-Far y N. Pimstone (1986) *Cancer Res.* **46**: 4390
341. D. Kessel (1986) *Cancer Lett.* **33**: 183
342. K. W. Woodburn, S. Stylli, J. S. Hill, A. H. Kaye, J. A. Reiss y D. R. Phillips (1992) *Br. J. Cancer* **65**: 321
343. H. Taub, V. Krupa y G. Marks (1976) *Biochem. Pharmacol.* **25**: 511
344. Y. Frater, A. Brady, E. A. Lock y F. De Matteis (1993) *Arch. Toxicol.* **67**: 179.
345. L. Clarke y D. J. Waxman (1989) *Cancer Res.* **49**: 2344.
346. R. R. Misra , N. A. Lorr y S. E. Bloom (1991) *Arch. Toxicol.* **65**: 32.
347. N. E. Sladek (1972) *Cancer Res.* **32**: 535.
348. P. R. Ortiz de Montellano y M. A. Correia (1983) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**: 481.
349. G. A. LeBlanc y D. J. Waxman (1990) *Cancer Res.* **50**: 5720

ABREVIATURAS

A1A	alilisopropilacetamida
A1A	ácido δ -aminolevulinico
ALAS-E	ALA-sintasa eritroide
ALAS-N	ALA-sintasa hepática
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CF	ciclofosfamida
CoA	coenzima A
DDC	3,5-dietoxycarbonil-1,4-dihidrocolidina
DENA	dietilnitrosamina
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
HCB	hexaclorobenceno
HMM	hexametilmelamina
HPD	derivado de hematoporfirina
HPLC	cromatografía líquida de alta presión
IARC	International Agency for Research on Cancer
K_m	constante de Michaelis-Menten
L	hígado sin masa tumoral definida
LT	hígado con masa tumoral bien definida
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
NADPH	dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato, forma reducida
NMU	N-nitroso N-metilurea
PB	fenobarbital
PBG	porfobilinógeno
PCL	porfirinógeno carboxi-liasa
PCT	porfiria cutánea tarda
PDT	terapia fotodinámica del cáncer
prot.	proteínas
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sodio
S.E.M.	desviación estándar de la media
SKF 525 A	clorhidrato de 2,2 dietil-aminoetil-2,2-difenil-valerato
TRIS	trihidroximetilaminometano
tRNA	ácido ribonucleico de transferencia

TCA	ácido tricloroacético
URO I	uroporfirina I
V_{max}	velocidad máxima

L. Sanabria

Guinea B. Pacheco