

Tesis Doctoral

Pseudoporfiria humana y experimental

Guolo, Marcelo Nestor

[1999?]

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 Master's and 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:

Guolo, Marcelo Nestor. ([1999?]). Pseudoporfiria humana y experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n2979_Guolo

Cita tipo Chicago:

Guolo, Marcelo Nestor. "Pseudoporfiria humana y experimental". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [1999?].

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n2979_Guolo

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PSEUDOPORFIRIA HUMANA Y EXPERIMENTAL

POR

MARCELO NESTOR GUOLO

DIRECTOR: ANA MARIA STELLA

CO-DIRECTOR: ALCIRA BATLLE

LUGAR DE TRABAJO: CENTRO DE INVESTIGACIONES SOBRE
PORFIRINAS Y PORFIRIAS (CIPYP)

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS AMIGOS

INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	
ABREVIATURAS	iii
OBJETIVOS	1
INTRODUCCION	
• CAPITULO I: QUIMICA Y ESTRUCTURA DE LOS TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS.	
I.1. Compuestos tetrapirrólicos	1
I.2. Porphirinas	1
I.2.1. Estructura, nomenclatura	1
I.2.2. Propiedades físicas	5
I.2.3. Funciones biológicas	9
I.3. Bibliografía	11
• CAPITULO II: BIOSINTESIS DEL HEMO - ENZIMAS	
II.1. Biosíntesis del hemo	13
II.2. Enzimas del camino metabólico del hemo	17
II.2.1. δ -aminolevúlico sintetasa	17
II.2.2. δ -aminolevúlico dehidrasa	23
II.2.2. Porphobilinogenasa	30
II.2.3. Uroporphirinógeno decarboxilasa	39
II.2.4. Coproporphirinogenasa	44
II.2.5. Protoporphirinogenasa	48
II.2.6. Ferroquelatasa	51
II.3. Bibliografía	54
• CAPITULO III: PORFIRIAS	
III.1. Introducción	79
III.2. Defectos enzimáticos en las porfirias	81
III.3. Porphiria aguda intermitente	82
III.4. Porphiria por deficiencia del ALA-D	84
III.5. Porphiria variegata	86
III.6. Coproporphiria hereditaria y harderoporfiria	88

III.7.	Porfiria cutánea tarda y Porfiria hepatoeritropoyética.....	88
III.8.	Protoporfirina eritropoyética.....	92
III.9.	Porfiria congénita eritropoyética.....	93
III.10.	Bibliografía.....	96
• CAPITULO IV: PSEUDOPORFIRIAS		
IV.1.	Introducción.....	105
IV.2.	Pseudoporfirina en pacientes hemodializados.....	106
	IV.2.1. Síntomas agudos en la pseudoporfirina aguda del hemodializado.....	107
	IV.2.2. Alteración en la biosíntesis del hemo en la pseudoporfirina aguda del hemodializado.....	114
	IV.2.3. Síntomas cutáneos en la pseudoporfirina cutánea del hemodializado.....	116
	IV.2.4. Alteraciones de la biosíntesis del hemo en la pseudoporfirina cutánea del hemodializado.....	117
IV.3.	Pseudoporfirina experimental.....	118
IV.4.	Porfiria en pacientes hemodializados.....	121
IV.5.	Bibliografía.....	124
• CAPITULO V: AMINOACIDOS Y PROTEINAS.....		
V.1.	Generalidades.....	141
V.2.	Secuencia y estructuras.....	143
V.3.	Metodo de Sanger.....	144
V.4.	Procedimientos para la secuenciación. Reacción de Edman.....	146
V.5.	Procedimientos para la secuenciación cuando el N-terminal está bloqueado.....	152
V.6.	Bibliografía.....	155
• CAPITULO VI : MATERIALES Y METODOS		
VI.1.	Reactivos:.....	156
VI.2.	Materiales.....	156
	VI.2.1. Animales.....	157
	VI.2.1.1. Eritrocitos.....	157
	VI.2.1.2. Hígados y riñones.....	157
	VI.2.1.3. Purificación del ALA-D de hígado porcino.....	158
	VI.2.2. Material humano.....	159

	VI.2.2.1. Eritrocitos	159
	VI.2.2.1.1. Purificación del ALA-D de eritrocitos.....	160
VI.3.	Métodos.....	161
	VI.3.1. Determinación de las actividades enzimáticas	161
	VI.3.1.1 ALA-D en glóbulos rojos de pacientes hemodializados y controles	163
	VI.3.1.2. PBG-D en glóbulos rojos.....	163
	VI.3.1.3. URO-D en glóbulos rojos	164
	VI.3.1.4. Unidad enzimática	165
	VI.3.2. Determinación de proteínas	165
	VI.3.3. Determinación de ALA y PBG en plasma	166
	VI.3.4. Determinación de porfirinas en plasma	167
	VI.3.5. Calentamiento, tratamiento con tripsina y TCA del plasma.....	168
	VI.3.6. Determinación de glutatión reducido y oxidado	169
	VI.3.7. Determinación de porfirinas en orina.....	171
	VI.3.8. Determinación del peso molecular	172
VI.4.	Modelo experimental de pseudoporfiria.....	173
VI.5.	Aislamiento, purificación, análisis y secuencia de aminoácidos del inhibidor.....	175
	VI.5.1 Purificación del inhibidor	175
	VI.5.2. Determinación de la capacidad inhibitoria del inhibidor:	176
	VI.5.3. SDS-PAGE en minigeles:	177
	VI.5.4. Tinción de minigeles con coomasie-blue.....	178
	VI.5.5. Tinción con plata de minigeles.....	179
	VI.5.6. SDS-PAGE para el aislamiento del inhibidor	180
	VI.5.7. Electroelución de la banda proteica del inhibidor.....	181
	VI.5.8. Electrotransferencia de la proteína a polivinil difluoruro (PVDF).....	183
	VI.5.9. Análisis de aminoácidos	185
	VI.5.10. Secuenciación del inhibidor.....	186
	VI.5.11. Clivaje con BrCN del inhibidor inmovilizado en PVDF.....	186

VI.5.12. Desbloqueo del N-terminal del inhibidor inmovilizado en PVDF	187
VI.5.13. Aislamiento químico de una secuencia única desde una mezcla de polipéptidos	189
VI.5.14. Aislamiento de péptidos para microsecuenciación por digestión proteolítica en SDS-PAGE	189
VI.6. Determinación del Km y el Ki	191
VII.7. Análisis estadístico de los resultados	192

RESULTADOS Y DISCUSION

- **CAPITULO VII: MODELO EXPERIMENTAL DE PSEUDOPORFIRIA**

VII.1. Introducción.....	196
VII.2. Porfirinas urinarias.....	198
VII.3. ALA-D eritrocitaria.....	199
VII.4. ALA-D en riñón.....	200
VII.5. ALA-D en hígado.....	201
VII.6. Conclusiones.....	204

- **CAPITULO VIII: ALTERACION EN EL METABOLISMO DEL HEMO EN PACIENTES HEMODIALIZADOS**

VIII.1. ALA y PBG en plasma	205
VIII.2. Actividades de ALA-D y Deaminasa en sangre.....	207
VIII.3. Actividad de URO-D en sangre.....	208
VIII.4. Efecto de los iones zinc y el calentamiento.....	208
VIII.5. Zinc en plasma.....	213
VIII.6. Discusión y conclusiones	214
VII.4. Bibliografía	216

- **CAPITULO IX: DETERMINACION DE LOS NIVELES DE GLUTATION EN GLOBULOS ROJOS Y PLASMA**

IX.1. Introducción.....	218
IX.2. Bibliografía	221

- **CAPITULO X : AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL FACTOR PLASMATICO**

X.1. Introducción.....	222
X.2. Electroforesis de las fracciones inhibitorias.....	223

X.3.	Actividad de la enzima ALA-D de glóbulos rojos normales en presencia de proteína electroeluída.....	224
X.4.	Electroforesis de las fracciones inhibitorias y determinación del PM del inhibidor.....	224
X.5.	Composición de aminoácidos del inhibidor.....	227
X.6.	Secuenciación del inhibidor.....	230
• CAPITULO XI: ESTUDIOS CINETICOS		
XI.1.	Determinación del Km del ALA-D de glóbulos rojos de normales y pacientes hemodializados	
XI.2.	Cinética de inhibición del péptido de 56,2 kDa sobre el ALA-D	
• CAPITULO XII: NIVELES DEL INHIBIDOR Y GLUTATION EN PLASMA DE PACIENTES TRANSPLANTADOS		
XII.1.	Efecto del plasma de pacientes HD y recientemente transplantados sobre la actividad de la enzima de GR normales	240
XII.2.	Niveles de glutatión en plasma de pacientes HD recientemente trasplantados y controles	241
• CAPITULO XIII: EFECTO DEL ZINC, HIERRO Y GLUTATION SOBRE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA		
XIII.1.	Efecto del zinc.....	243
XIII.2.	Efecto del hierro.....	244
XIII.3.	Efecto del glutatión.....	246
	DISCUSION FINAL.....	247

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a:

- A mi directora, la Dra. Ana María Stella, quien me ha orientado durante el desarrollo del trabajo.
- A la Dra. Alcira Batlle por su estímulo y continua atención, brindando su apoyo e invaluable experiencia.
- A la Dra Mirta Biscoglio por su ayuda en la realización de experiencias en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA.
- A la Lic. Claudia Machalinski por su constante dedicación en las experiencias.
- A la Lic. Laura Varela y Viviana Melito por su constante ayuda con el manejo de los animales, realización de experiencias y por su compañerismo
- A los Doctores M. Pataro y C. Franco, del Instituto Argentino de Riñón y Transplante, por el suministro de las muestras de sangre de pacientes hemodializados
- A mis amigos Carina Cardalda, Manuel Mendez, Adriana Casas, Adriana De Siervi, Alejandra Caballero y Esther Gerez que hicieron grata mi tarea con su aliento y compañerismo.
- A mis amigos, el Lic. en Sistemas Javier Iseberg por su colaboración en la corrección de los manuscritos e impresión de los distintos ejemplares y al Lic. Gerardo Palanco por su invaluable ayuda.

- A Guillermo Noriega y Fernando Princ por la cesión de dos figuras incluidas en este trabajo.
- A la Sra Beatriz Riccillo de Aprea y Laura Dato por las extracciones de sangre realizadas a los pacientes hemodializados.
- A todos los compañeros del CIPYP.

ABREVIATURAS

ALA	Acido δ -aminolevúlico
ALA-D	ALA-Dehidrasa
ALA-DP	Porfiria deficiente en ALA-D
ALA-S	ALA-Sintetasa
ALA-SE	ALA-S eritroide específico
ATP	Adenosina trifosfato
Copro	Coproporfirina
Coprogen	Coproporfinógeno
CPGasa	Coproporfinogenasa
CPH	
CPH	Coproporfiria Hereditaria
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOVA	γ - δ -Dioxovalerato
DOVA-T	Dova-transaminasa
DTNB	Acido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)
Fequel	Ferroquelatasa
Firia	Firiaporfirina
Gli	Glicina

GR	Glóbulos rojos
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HD	Hemodializado
Hepta	Heptaporfirina
Hexa	Hexaporfirina
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
Isocopro	Isocoproporfirina
PABA	Acido p-aminobenzoico
PAI	Porfiria aguda intermitente
PBG	Porfobilinógeno
PBGasa	Porfobilinogenasa
PCE	Porfiria congénita eritropoyética
PCT	Porfiria cutánea tarda
Penta	Pentaporfirina
PHE	Porfiria hepatoeritropoyética
PM	Peso molecular
PPE	Protoporfiria eritropoyética
PPGox	Protoporfirinógeno oxidasa
Proto	Protoporfirina
Protogen	Protoporfirinógeno
PV	Porfiria Variegata
SAM	S-adenosil-metionina
SDS	Dodecil sulfato de sodio

Succ	Succinato
Succ. CoA	Succinil CoA
TEMED	N,N,N'N'-tetrametilendiamina
URO	Uroporfirina
URO-D	Urogen Decarboxilasa
Urogen III-S	Isomerasa
Urogen	Uroporfirinógeno
UV	Ultravioleta

OBJETIVOS:

Si bien las pseudoporfirias no son enfermedades metabólicas presentan alteraciones en el metabolismo del hemo.

La pseudoporfiria en hemodiálisis se caracteriza por una falla parcial en la actividad del ALA-D en sangre de pacientes hemodializados al igual que en la Nueva Porfiria Aguda y las adquiridas por plomo, alcohol o en los casos de tirosinemia. Como consecuencia de ello se acumula ALA. La hemodiálisis recupera parcialmente estos parámetros bioquímicos, aunque no los lleva a la normalidad.

A su vez, el ALA-D es una enzima oligomérica, y de sus 8 subunidades sólo 2 constituyen el dímero funcional, donde el zinc y los grupos sulfhidrilos juegan un papel importante en el mantenimiento del mismo.

En base al conocimiento sobre las alteraciones del camino metabólico del hemo y sus metabolitos nos interesó llevar a cabo un estudio completo en sangre de pacientes hemodializados pseudoporfiricos, antes y después del tratamiento de diálisis, con el objetivo de establecer los parámetros bioquímicos en la pseudoporfiria en pacientes hemodializados y en el modelo experimental de Pseudoporfiria por ácido nalidíxico.

Debe enfatizarse que si bien se realizaron los estudios en pacientes hemodializados, los mismos se extendieron a pacientes con trasplante renal reciente, llevándose a cabo el estudio de las enzimas y los niveles de metabolitos como glutatión y zinc, que pueden estar asociados a alteraciones metabólicas.

Se ha estudiado además, la estructura y cinética de inhibición del ALA-D de GR de un factor plasmático presente en plasma de pacientes hemodializados y con trasplante renal.

INTRODUCCION

CAPITULO I

QUIMICA Y ESTRUCTURA DE LOS TETRAPIRROLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS.

	Página
I.1. Compuestos tetrapirrólicos.....	1
I.2. Porfirinas	1
I.2.1. Estructura, nomenclatura	1
I.2.2. Propiedades físicas	5
I.2.3. Funciones biológicas.....	9
I.3. Bibliografía	11

I.1. COMPUESTOS TETRAPIRROLICOS:

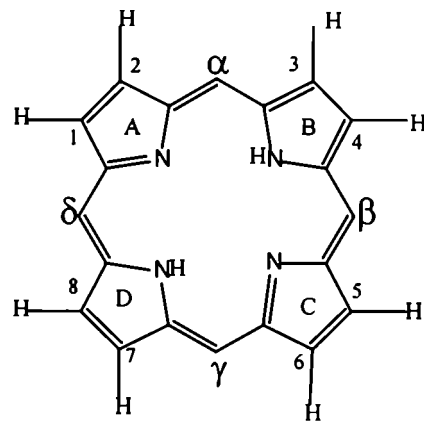
Los compuestos tetrapirrólicos, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y cumplen funciones fisiológicas fundamentales en todas las células vivas. Entre ellos se encuentran las porfirinas y sus derivados, las metaloporfirinas y las hemoproteínas.

Los distintos tetrapirroles participan en un gran número de procesos fisiológicos importantes como: el transporte de electrones y energía (citocromos y clorofila), transporte gaseoso (hemoglobina y mioglobina), reacciones de oxidación (peroxidasas, catalasas), hidroxilaciones biológicas (mono y dioxigenasas), ciclo biológico del nitrógeno y del azufre (grupo prostético de la nitrito y sulfito reductasa), metilaciones (vitamina B₁₂).

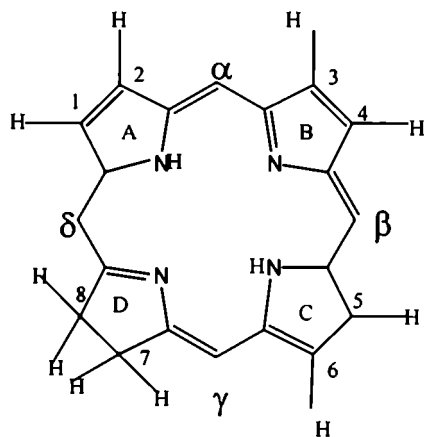
I.2. PORFIRINAS:

I.2.1 ESTRUCTURA,NOMENCLATURA:

Los tetrapirroles naturales o sintéticos derivan de dos núcleos básicos: porfina y clorina (Figura I.1.). Estos núcleos están constituidos por cuatro anillos pirrólicos (A,B,C y D), unidos entre sí por medio de cuatro puentes metileno α , β , γ y δ . La diferencia entre la estructura de la porfina y la clorina consiste simplemente en que, en esta última, el anillo D se encuentra reducido.



I



II

FIGURA I.1.: Representación de las estructuras de la porfina (I) y de la clorina (II).

La presencia de un sistema de dobles ligaduras alternadas en este compuesto cíclico de 16 átomos internos, da como consecuencia una estructura resonante, estable y planar (Batlle, 1986). Esta estructura contiene ocho cadenas laterales unidas en las posiciones β -carbono de cada anillo pirrólico, que según la nomenclatura de Fischer, son numeradas del 1 al 8 a partir del anillo A. El tipo de cadena lateral determina las características físicas de la porfirina resultante.

Las distintas estructuras de los tetrapirroles presentes en la naturaleza derivan de estos dos esqueletos básicos que han sufrido ciertas modificaciones:

1. Sustitución parcial o total de los átomos de carbono externos (1 al 8) por restos alquilo.
2. Sustitución o reemplazo sobre los puentes meténicos; los sustituyentes pueden ser átomos de hidrógeno, como aparecen en los porfirinógenos, o un anillo ciclopentanona como en las clorofilas, o un reemplazo como ocurre en el anillo porfirínico de la corrina, típico de los derivados de la vitamina B₁₂, en el cual se ha perdido el puente meténico δ .
3. Inserción de un metal, conduciendo a la formación de las metaloporfirinas.

Cabe destacar que todos los tetrapirroles fisiológicamente activos pertenecen a la serie isomérica III, aunque debe agregarse que

naturalmente se han encontrado también derivados de la serie I que no cumplen rol fisiológico alguno y son el resultado de alteraciones en el camino metabólico de los tetrapirroles.

El metabolito biológicamente activo o fisiológico no lo constituye la porfirina, sino el porfirinógeno (Figura I.2.), en el cual los puentes metileno se encuentran reducidos.

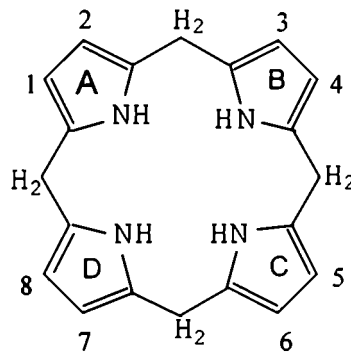


FIGURA I.2.: Estructura de los porfirinógenos

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

Tabla I-1.: Porfirinas de interés biológico

NOMBRE	SUSTITUYENTE							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Numeración de Fischer								
Etioporfirina I	M	E	M	E	M	E	M	E
Etioporfirina II	M	E	E	M	M	E	E	M
Etioporfirina III	M	E	M	E	M	E	E	M
Etioporfirina IV	M	E	E	M	E	M	M	E
Uroporfirina I	A	P	A	P	A	P	A	P
Uroporfirina III	A	P	A	P	A	P	P	A
Porfirina heptacarboxilada III	M	P	A	P	A	P	P	A
Porfirina hexacarboxilada III	M	P	M	P	A	P	P	A
Porfirina pentacarboxilada III	M	P	M	P	M	P	P	A
Dehidroisocoproporfirina III	M	V	M	P	M	P	P	M
Coproporfirina I	M	P	M	P	M	P	M	P
Coproporfirina III	M	P	M	P	M	P	P	M
Protoporfirina IX	M	V	M	V	M	P	P	M
Mesoporfirina IX	M	E	M	E	M	P	P	M
Hematoporfirina IX	M	HE	M	HE	M	P	P	M
Deuteroporfirina IX	M	H	M	H	M	P	P	M

M: $-\text{CH}_3$; E: $-\text{C}_2\text{H}_5$; A: $-\text{CH}_2\text{COOH}$; P: $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$; V: $-\text{CH}=\text{CH}_2$; HE: CHOHCH_3

I.2.2. PROPIEDADES FÍSICAS:

Desde el punto de vista histórico, el origen de las porfirinas se remonta hacia muchos millones de años atrás, en la época del Pleistoceno y comienzos del Eoceno, cuando las porfirinas se depositaron

sobre conchas fósiles que aún hoy se pueden encontrar manteniendo su estructura prácticamente inalterada. La formación de estos complejos en condiciones abióticas contemporánea con la aparición de la vida en la Tierra posibilitó y aumentó la eficiencia de los procesos de óxido-reducción que ocurrían en la primitiva atmósfera anaeróbica transformándola en aeróbica (Simionescu et al., 1978).

La participación de las porfirinas en estos cambios fundamentales de la evolución de nuestro planeta destaca la significativa importancia de estos pigmentos vitales (Batlle y Enriquez de Salamanca, 1988).

Las porfirinas derivan de los tetrapirroles libres de metales que se diferencian estructuralmente por la naturaleza y ordenamiento de las cadenas laterales que han sustituido las posiciones 1 a 8 de los anillos pirrólicos. Esta estructura confiere a estos compuestos propiedades hidrofóbicas, que se modifican por la presencia de los sustituyentes laterales alifáticos portadores de grupos hidrofílicos.

Los primeros intermediarios de la síntesis del hemo poseen mayor número de sustituyentes acídicos, lo que las hace más solubles en agua (Uroporfirina, Coproporfirina) en tanto que cuanto menos sean los restos ácidos, menos será su solubilidad en agua (Protoporfirina). Los solventes orgánicos más comunmente empleados para su extracción son el dioxano y el éter.

Las porfirinas poseen espectros de absorción típicos que son de fundamental importancia para su identificación y determinación cuantitativa. El sistema conjugado de dobles ligaduras en el núcleo de las porfirinas, es el cromóforo responsable de la existencia de fuertes bandas de absorción en las regiones visible y ultravioleta cercano del espectro.

Todas las porfirinas exhiben un máximo de absorción en la región entre los 350 y 450 nm, conocida como banda de Soret, que es la que se emplea generalmente para la cuantificación de estos pigmentos. En solventes orgánicos o en soluciones alcalinas débiles presentan un espectro típico de 4 bandas en la región visible, además de la banda de Soret. En estas condiciones las porfirinas exhiben un color rojo o rojo amarronado, según la concentración.

Las cadenas laterales sustituyentes en los anillos pirrólicos no influyen en el patrón ni en la intensidad relativa de las bandas, pero modifican la posición y la intensidad absoluta; en consecuencia, constituyen un buen criterio para la identificación de las porfirinas.

Las porfirinas emiten una intensa fluorescencia roja cuando se excitan con la luz ultravioleta (aproximadamente 400 nm). Esta propiedad se emplea en el estudio de las porfirinas en plasma de pacientes porfíricos con una herramienta para el diagnóstico de la enfermedad. La intensidad de la fluorescencia depende del solvente y del pH, así es mínima en el punto isoeléctrico y máxima en ácidos minerales, como el HCl a pH 1,0.

Los porfirinógenos, derivados reducidos de las porfirinas, son incoloros y no fluorescen.

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

Además, estas sustancias tienen la capacidad de formar quelatos con iones de varios metales como magnesio (Mg), hierro (Fe) y cobalto (Co). En estos complejos metal-porfirina el átomo metálico queda firmemente unido en el espacio determinado por los cuatro átomos de nitrógeno centrales del anillo porfirínico. El sistema básico de estos complejos presenta un color rojo-rosado aunque existen algunas porfirinas parcialmente reducidas de color verde. El color de cada compuesto depende de la naturaleza del átomo metálico central (Falk, J, 1964; Batlle y Magnin, 1988).

Las porfirinas manifiestan una apreciable sensibilidad a la luz, fundamentalmente a las radiaciones UV. Esta fotosensibilidad disminuye con el aumento del número de grupos carboxílicos y el pH del medio influye particularmente. La acción fotosensibilizadora de las porfirinas en piel hace que estos compuestos tengan gran importancia en dermatología, y es uno de los primeros signos clínicos que conducen al diagnóstico de las porfirias cutáneas. Esta propiedad también se utiliza en la detección y destrucción de ciertos tipos de cancer (Batlle, 1993).

I.2.3. FUNCIONES BIOLÓGICAS:

Numerosos compuestos de importancia biológica poseen en su estructura como grupo prostético a una hierroporfirina. El hemo o sus derivados constituyen el grupo prostético de las hemoproteínas. Entre ellas se incluyen:

- A) Hemoglobina y mioglobina: La hemoglobina es un componente de los glóbulos rojos, responsable del transporte de gases (O_2 , CO_2) en la sangre. Está constituida por 4 subunidades, cada una de las cuales lleva un hemo en una cavidad hidrofóbica de la globina. La mioglobina es una hemoproteína que consta de una sola cadena proteica unida a un hemo. Posee semejanza a la hemoglobina en cuanto a su capacidad para unirse reversiblemente al oxígeno; contribuye a la difusión del mismo en los tejidos, así como a su almacenamiento en el músculo.
- B) Citocromos: Su principal función biológica es la transferencia reversible de electrones. En el citocromo el grupo prostético es una hierroporfirina en la que un grupo formilo reemplaza a un metilo y una cadena hidrocarbonada reemplaza a un vinilo. El citocromo-b contiene un protohemo unido en forma no covalente a la proteína y el citocromo-c existe una unión tioéter entre un grupo vinilo y un sulfhidrilo de la cisteína proteica. Por otro lado el citocromo-d contiene una hierro-hidroporfirina (clorina) como grupo prostético.

El citocromo P₄₅₀ microsomal es una hemoproteína unida a monóxido de carbono que cataliza oxidaciones de función mixta, forma parte de algunas monooxigenasas que hidroxilan, mediante el oxígeno molecular, una gran variedad de compuestos tales como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, ácidos grasos, esteroides y porfirinas (Porter, T & Coon, M.,1991).

- C) Catalasas: descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, son altamente específicas y emplean al peróxido de hidrógeno como oxidante y reductor .
- D) Peroxidasas: Catalizan la oxidación de distintos compuestos orgánicos por peróxido de hidrógeno.
- E) Triptofano pirrolasa: Posee una protohematina IX como grupo prostético. Cataliza la ruptura oxidativa del anillo pirrólico del triptofano.

Las porfirinas se pueden combinar con otros metales distintos al hierro dando lugar a otros compuestos también fundamentales para la vida como la clorofila que posee un magnesio en su estructura. En las plantas superiores y en las algas verdes, organismos fotosintéticos que generan oxígeno, existen dos tipos de clorofilas, la clorofila-a y la clorofila-b que cumplen un papel específico en el mecanismo fotosintético (Battersby, 1988; Jordan, 1990).

BIBLIOGRAFIA

BATLLE, A. M. del C.: Tetrapyrrole biosynthesis, *Semin. Dermatol.*, 5; 70-86, 1986.

BATLLE, A.M. del C.: Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy; a model for carcinogenesis. *J.Photochem. Photobiol. B.*, 20; 5-22, 1993.

BATLLE, A. M. Del C. y ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R.: La importancia de la formación abiogénica de las porfirinas en la evolución química de la vida. *Biométrica*, 13; 9-12, 1988.

BATLLE, A.M. del C. y MAGNIN, P. H.: Porfirias humanas y experimentales. Aspectos clínicos y bioquímicos. *Acta Bioquímica Latinoamericana* No 2,1988 (editado por la Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires).pp. 3-78.

BATTERSBY, A.R.: Biosynthesis of the pigments of life. *J. Nat. Prod.*, 51; 629-642, 1988.

FALK, J.: Porphyrins and metalloporphyrins: their general, physical and coordination chemistry, and laboratory methods. Elsevier, Amsterdam, 3-17, 1964.

JORDAN, P.M.: Biosynthesis of haems and Chlorophylls; Dailey, H.A. ed.,
Mc Graw Hill, New York , 55-121, 1990.

PORTER, T. & COON, M.: Cytochrome P-450, Multiplicity of isoforms,
substrates, catalytic and regulatory mechanisms. J. Biol. Chem., 266, 21,
13469-13472, 1991.

SIMIONESCU, C.I; MORA, R. & SIMIONESCU, B.C.: Porphyrins and
the evolution of biosystems. Bioelectrochemistry and bioenergetics, 5; 1-
17, 1978.

CAPITULO II

BIOSINTESIS DEL HEMO - ENZIMAS

	Página
II.1. Biosíntesis del hemo	13
II.2. Enzimas del camino metabólico del hemo	17
II.2.1. δ -aminolevúlico sintetasa.....	17
II.2.2. δ -aminolevúlico dehidrasa	23
II.2.3. Porfobilinogenasa.....	30
II.2.4. Uroporfirinógeno decarboxilasa	39
II.2.5. Coproporfirinogenasa.....	44
II.2.6. Protoporfirinogenasa	48
II.2.7. Ferroquelatasa	51
II.3. Bibliografía	54

II.1. BIOSINTESIS DEL HEMO:

La elucidación de las primeras etapas del camino de la biosíntesis del hemo fueron el resultado de una serie de brillantes trabajos, que demostraron que los átomos de carbono y nitrógeno presentes en las porfirinas provenían de los precursores glicina y ácido succínico (Shemin & Rittenberg, 1951; Dresel & Falk, 1953; Neuberger & Scott, 1953; Shemin & Russel, 1953; Cookson & Rimington, 1954; Rimington, 1958).

La mayoría de las células vivientes son capaces de sintetizar sus tetrapirroles, a partir de moléculas pequeñas, por el denominado camino biosintético de las porfirinas, que involucra la actividad de 8 enzimas (Figura II.1).

Los dos principales órganos involucrados en la síntesis del hemo son la médula ósea y el hígado. En la médula ósea, el hemo se sintetiza en los eritroblastos y reticulocitos, que poseen mitocondrias, mientras que los eritrocitos circulantes carecen de la capacidad de síntesis.

Las enzimas ácido δ -aminolevúlico sintetasa (ALA-S), Coproporfirinogenasa (CPGasa), Protoporfirinógeno oxidasa (PPGox) y

Ferroquelatasa (Fequel) se localizan en las mitocondrias, mientras que las enzimas ácido δ -aminolevúlico dehidrasa (ALA-D), Porfobilinogenasa (PBGasa) y Urogen decarboxilasa (URO-D) se encuentran en el citosol (Figura II.1).

Una molécula de glicina (Gli) y una molécula de succinato (Succ), derivados del ciclo de los ácidos tricarbónicos, se condensan para dar una molécula de ácido δ -aminolevúlico (ALA) por acción del ALA-S.

En plantas superiores (Beale & Castelfranco, 1974), algas (Gassman et. al, 1968), tejidos animales (Varticovski et al., 1980) y bacterias (Bajkowski & Friedmann,, 1982) se ha propuesto que funciona además una ruta alternativa para la síntesis de ALA, a través de la conversión de glutamato en δ -dioxovalerato (DOVA) en ALA por acción de la enzima glutamato-DOVA transaminasa.

La biosíntesis prosigue con la condensación de dos moléculas de ALA que genera el monopirrol no saturado porfobilinógeno (PBG) por acción de la enzima ALA-D. Para que esta reacción se produzca el ALA debe atravesar las membranas mitocondriales mediante un transporte activo (Bermúdez Moretti et al., 1993).

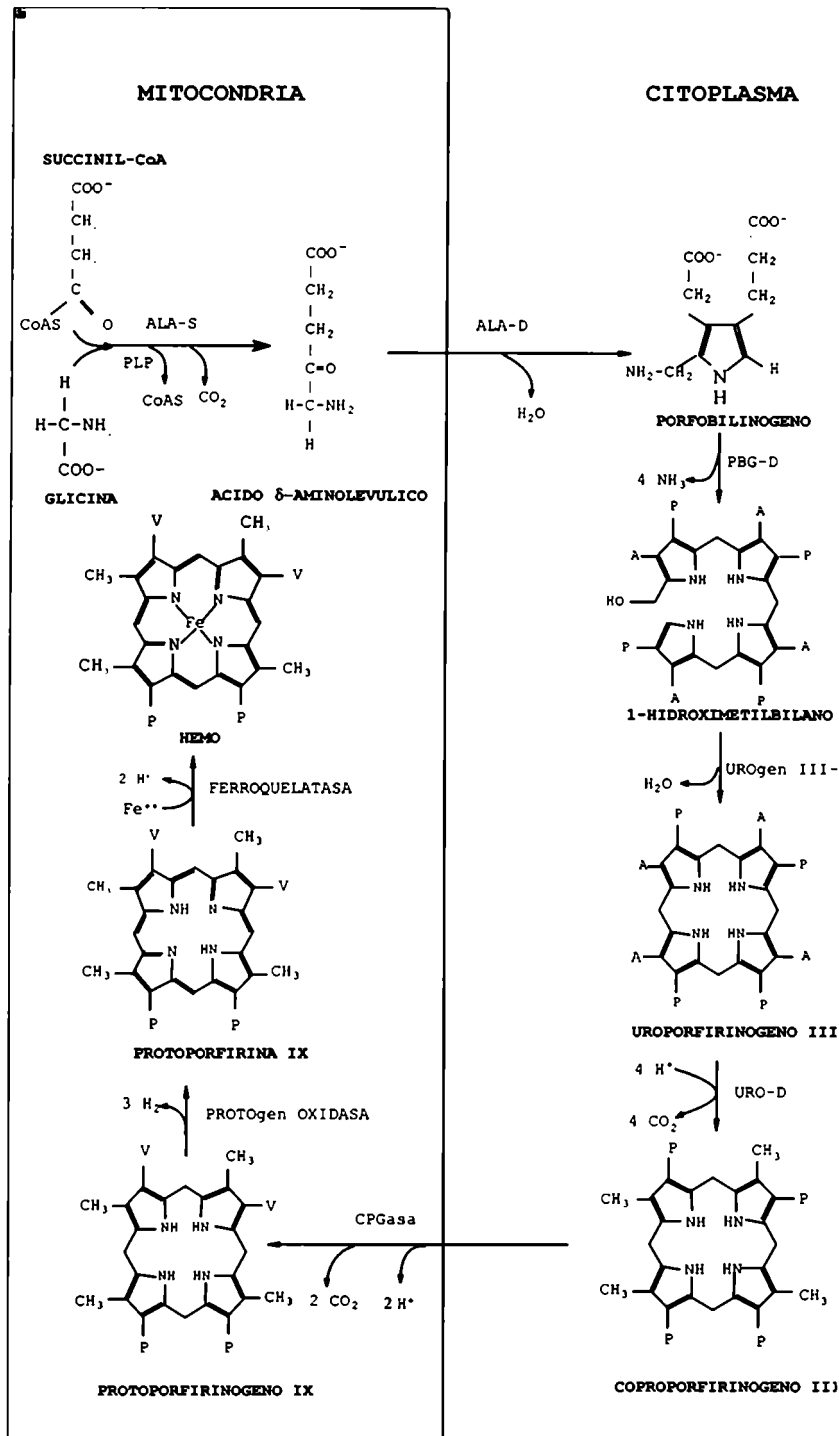


FIGURA II.1.: Camino biosintético del hemo: ALA-S = δ -Aminolevúlico Sintetasa; ALA-D = δ -Aminolevúlico Dehidrasa; PBG-D = Porfobilinógeno-Deaminasa; UROgen III-S = Uroporfirinógeno III sintetasa; URO-D = Uroporfirinógeno-decarboxilasa; CPGasa = Coproporfirinogenasa; PROTOgen OXIDASA = Protoporfirinógeno oxidasa.

Cuatro moléculas de PBG dan origen al UROgen III por acción del complejo enzimático PBG-asa. Este complejo está formado por dos enzimas, la PBG-Deaminasa (PBG-D) y la Uroporfirinógeno III Sintetasa o Isomerasa (UROgen III-S). El UROgen III es el primer tetrapirrol cíclico de la vía y posee una estructura asimétrica, con ocho grupos carboxilo en las cadenas laterales de los pirroles. La secuencia de reacciones que llevan a PROTO IX modifican las cadenas laterales y el grado de saturación del anillo porfirínico.

La URO-D, decarboxila la porfirina octacarboxílica para dar intermediarios con siete (Firia o Heptaporfirinógeno), seis (Hexaporfirinógeno) y cinco (Pentaporfirinógeno) carboxilos, llegando finalmente al Coproporfirinógeno III (Coprogen III) con cuatro carboxilos respectivamente.

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

Posteriormente, PPG-ox elimina seis átomos de hidrógeno del Protogen IX para formar PROTO IX. El último paso de la secuencia es la inserción de hierro en el anillo porfirínico por acción de la Fequel para generar el producto final hemo.

II.2. ENZIMAS DEL CAMINO METABOLICO DEL HEMO

II.2.1. ALA-SINTETASA:

EL ALA-S (EC 2.3.1.37) [(Succinil CoA: glicina C succinil transferasa (decarboxilante)] cataliza la formación de ALA a partir de glicina y succinil CoA mediante la formación del intermediario α -amino- β -cetoadípico. La reacción enzimática requiere de fosfato de piridoxal como cofactor. La enzima fue detectada originariamente en extractos de *Rhodopseudomonas spheroides* (Kikuchi et al.,1958) y en eritrocitos de pollo (Gibson et al.,1958). A partir de entonces, ha sido estudiada y medida en una gran variedad de fuentes. La actividad específica del ALA-S en el hígado es muy baja, y es limitante para la formación del hemo. El tiempo de recambio del ALA-S hepática es muy rápido.

En las células de mamíferos, la enzima se localiza en la membrana interna de la mitocondria (Mc Kay et al., 1969).

La actividad del ALA-S hepática es generalmente la más baja del camino del hemo, puede incrementarse marcadamente luego del tratamiento con diversas drogas; es por ello que se le asigna a esta enzima un rol regulatorio en esta vía biosintética (Granick & Sassa, 1971).

Se ha detectado baja actividad de esta enzima en otras fracciones subcelulares bajo determinadas condiciones experimentales (Hayashi et al., 1969; Whiting & Elliot, 1972). La regulación de la actividad del ALA-S difiere según el tejido; se ha encontrado que en tejidos no hepáticos su actividad no es limitante para la formación del hemo (Wada et al., 1967; Bottomley & Smithee, 1968; Wood, 1974).

Esta enzima se sintetiza como proteína precursora en los polirribosomas citoplasmáticos, que luego es transportada a la mitocondria, probablemente por una proteasa de la matriz.

Hay dos genes separados que codifican para el ALA-S, el ALA-S eritroide específico (ALA-SE) y el no específico del ALA-S (ALA-SN) (Whiting & Elliot, 1972; Ohashi & Kikuchi, 1977). El gen del ALA-SE humano codifica la síntesis de un precursor de 587 aminoácidos, cuyo PM es de 64,6 kDa. Las secuencias nucleotídicas del ALA-SE y de las isoformas del ALA-SN poseen una semejanza del 60%; sin homología en la región aminoterminal, mientras que la región subsiguiente al residuo 197 posee una homología del 73 %. El locus del gen del ALA-SN se localiza en 3p.21, en tanto que el del ALA-SE se encuentra en Xp11.21 (Yamamoto et al., 1985; Riddle et al., 1989; Dierks, 1990). La organización exón-intrón de los genes del ALAS ubicuo y el eritroideo se estudió en rata, ratón, pollo y en humanos (Figura II.2). El primer exón del ALA-S eritroideo se encuentra altamente conservado en las distintas

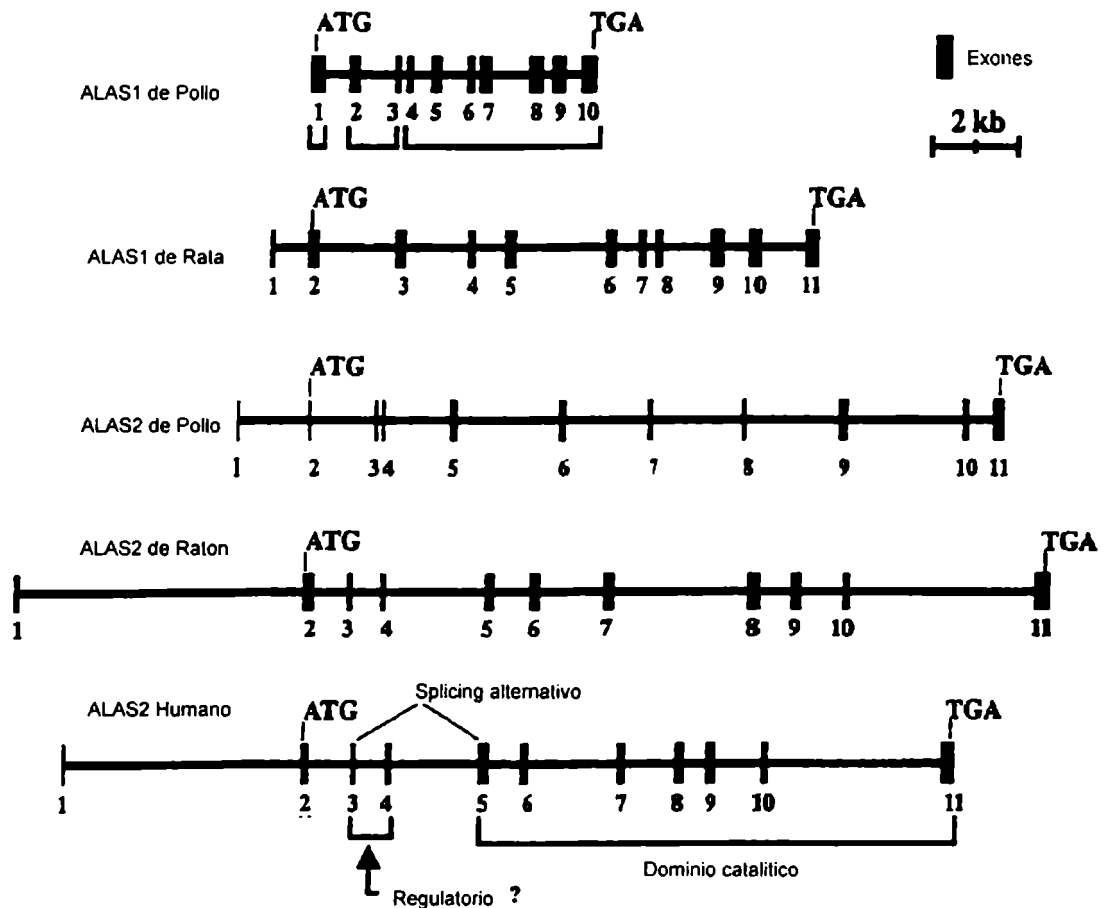


FIGURA II.2.: Organización estructural de los genes ALAS1 (ubicuo) y ALAS2. Los exones están numerados y ATG y TAA son los codones de iniciación y terminal respectivamente.

fuentes, los exones 5-11 abarcan al sitio catalítico de la enzima. Este arreglo conservado de los exones e intrones indica que los genes ubicuo y eritroideo evolucionaron de un gen ancestral común (Dierks et al., 1990).

En hígado, el hemo reprime la expresión del ALA-S a través de los

mecanismos de retroinhibición y represión (Kikuchi & Kagashi, 1982; Whiting & Granick, 1982; Yamamoto et al., 1983).

En contraste, la actividad del ALA-S en células eritroides no está relacionada directamente con la concentración intracelular de hemo (Bottomley & Smithee, 1968; Wood, 1974).

La vida media del ALA-S en mitocondrias hepáticas de mamíferos es de 68 minutos (Granick & Sassa, 1971; Hayashi et al, 1969) y de 160 minutos en cultivos de células de embrión de pollo (Sassa & Granick, 1970).

El mecanismo de acción más aceptado se esquematiza en la Figura II.3 (Zaman et al., 1973; Akhtar et al., 1976). Se postula la existencia de un grupo sulfhidrilo en el sitio activo, que es fundamental para que se inicie la reacción. En primer lugar se une el fosfato de piridoxal a la enzima mediante un átomo de nitrógeno del anillo pirimidínico y formando una base de Schiff entre el aldehído del cofactor y un grupo amino de un residuo lisina de la cadena polipeptídica. Luego la glicina se condensa con el fosfato de piridoxal para formar una nueva base de Schiff (I). Posteriormente el protón H_R de este complejo se libera y se une a un grupo básico de la enzima para originar un carbanión estable (II). Este intermediario reacciona con el átomo de carbono del carbonilo electrofílico de la succinil CoA para

producir el ácido α -amino- β -cetoaládico (III). Durante esta última conversión el protón H_R unido a la proteína se intercambia con un

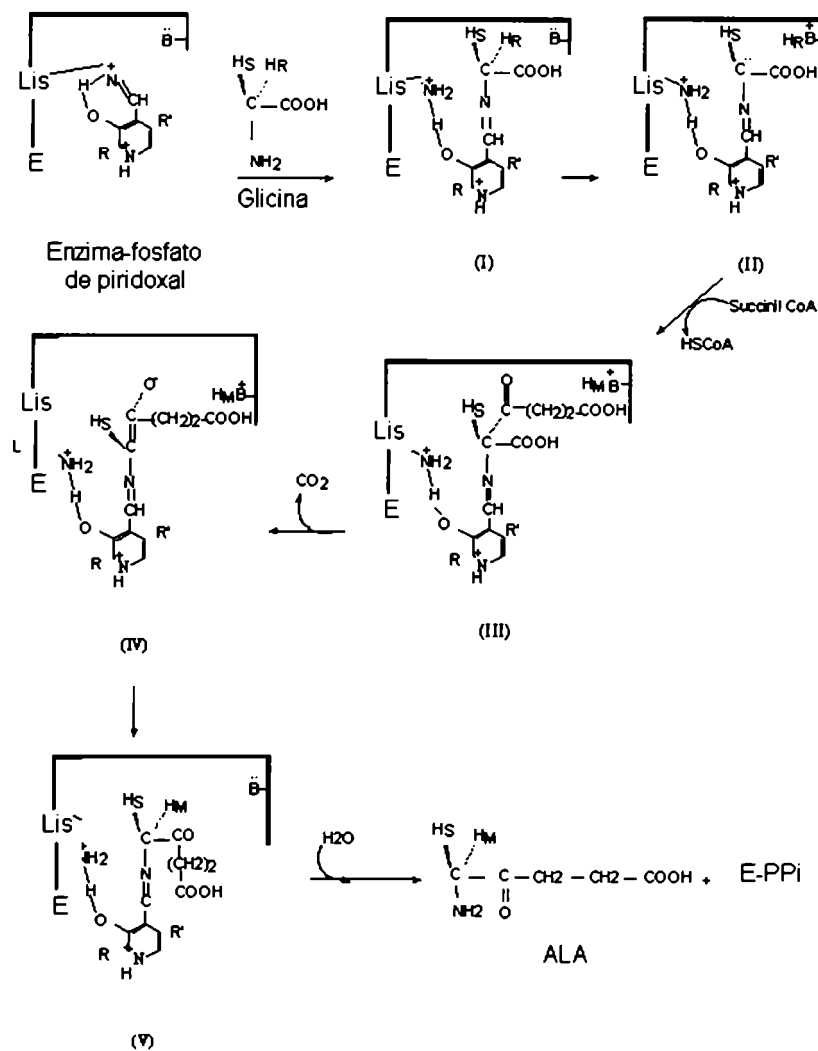


FIGURA II.3: Mecanismo de acción del ALA-S.

protón H_M proveniente del medio. A continuación el ácido α -amino- β -cetoaládico se descarboxila, eliminándose de esta manera el grupo carboxilo de la glicina como CO_2 (IV), se adiciona el protón H_M (V) y por hidratación el ALA se libera del complejo enzima-fosfato de piridoxal.

En plantas y bacterias existe una ruta alternativa para la síntesis de ALA a partir de precursores de cinco átomos de carbono (Beale & Castelfranco, 1974). En esta ruta, el C-1 del glutamato se convierte en el C-5 del ALA, a través de la formación de un intermediario activo, el γ,δ -dioxovalerato (DOVA), por acción de las glutamato y DOVA transaminasas (DOVA-T) (Figura II.4).

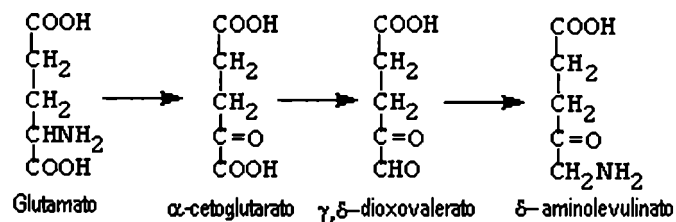


FIGURA II.4.: Ruta alternativa para la formación de ALA, a partir de glutamato o α -cetoglutarato vía γ,δ -dioxovalerato.

Luego se demostró que la transaminación de DOVA a ALA también ocurre en otras fuentes y en algunos casos la actividad de la DOVA-T resultó ser superior a la del ALA-S (Varticovski *et al.*, 1980; Lombardo *et al.*, 1988).

II.2.2. DELTA-AMINOLEVULICO DEHIDRASA:

La enzima ALA-dehidrasa (ALA-D) o PBG sintetasa (E.C. 4.2.1.24), cataliza la condensación en forma asimétrica, de dos moléculas de ALA llevando a la formación de PBG, compuesto cíclico, primer y único monopirrol natural del camino biosintético del hemo.

Fueron Dresel y Falk quienes postularon la existencia de la enzima responsable de la conversión de ALA a PBG (Dresel & Falk, 1953). A partir de entonces, se halló que el ALA-D estaba ampliamente distribuida en la naturaleza siendo aislada y estudiada en diversos organismos, entre otros: eritrocitos de aves (Dresel & Falk, 1953; Shemin & Russell, 1953), *Chlorella* (Granick, 1954), callos de soya (Tigier et al., 1970) e hígado bovino (Batlle et al., 1978; Tsukamoto et al., 1979) *Rhodobacter sphaeroides* (Delaunay et al., 1991), *Saccharomyces cerevisiae* (Correa García et al., 1993); *Chlamydomonas reinhardtii* (Matters et al., 1995), *Bradyrhizobium japonicum* (Chauhan, S & O'Brian, 1995), *Scenedesmus obliquus* (Stolz & Dörnemann, 1996); *Escherichia coli* (Jaffe et al., 1995, Cheung et al., 1997).

Es una enzima citoplasmática, termoestable y sulfhidrónica. Excepto en callos de soya (Tigier et al., 1970), en todos los otros sistemas

estudiados, la máxima actividad sólo puede obtenerse en presencia de compuestos tiólicos como cisteína, glutatión o ditioneitol, solos o combinados con zinc (Finelli et al., 1975). El ALA es su único sustrato.

El ALA-D es una enzima oligomérica formada por ocho subunidades similares de peso molecular aproximado de 35 kDa de manera que el PM es de 280 kDa (Wu et al., 1974, Spencer & Jordan, 1995). Puede formar fácilmente agregados consigo misma, de esta manera da lugar a la existencia de especies de distinto peso molecular en equilibrio (Stafforini *et al.*, 1980). La estructura mínima necesaria para la actividad es un dímero de peso molecular 70 kDa formado por dos tipos de subunidades; éstos tienen composición similar pero desempeñan distintos papeles en la síntesis de PBG (Batlle & Stella., 1978). Las subunidades de tipo A estarían involucradas en la formación de una base de Schiff con una molécula de ALA, mientras que las subunidades de tipo B unirían no covalentemente a la segunda molécula de sustrato. La enzima posee 1 átomo de zinc por subunidad.

La cantidad y actividad de ALA-D están generalmente en exceso, comparadas con el resto de las enzimas de la vía, en consecuencia, no juega un rol regulatorio en la formación de hemo (Granick, 1954). Sin embargo en ciertos organismos como levaduras (Labbe-Bois & Valland, 1977), *Rhizobium* (De Bonis et al, 1992) y *mucor Rouxii* (Paveto et al, 1983) el ALA-D es el paso limitante en el camino del hemo.

La enzima forma una base de Schiff con el sustrato, de esta forma ha sido posible determinar el número de sitios activos por mol de enzima. Así se ha demostrado que sólo cuatro de las ocho subunidades reaccionan con el ALA. El grupo amino involucrado en la formación de la base de Schiff en el sitio activo ha sido identificado como un residuo específico de lisina. El sitio catalítico de esta enzima está ubicado entre dos subunidades similares (dímero funcional) (Figura II.5) donde tiene lugar la síntesis de PBG (Batlle & Stella, 1978).

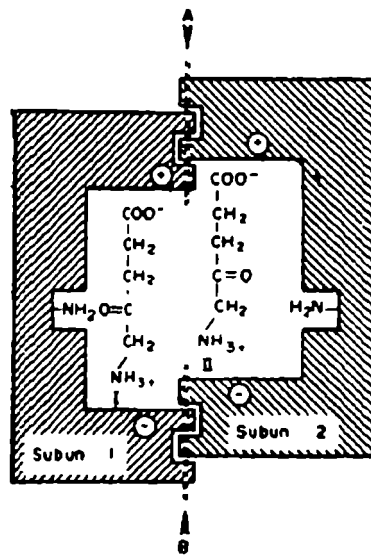


FIGURA II.5.: Dímero funcional del ALA-D

La subunidad 1 es la que forma la base de Schiff con una molécula de ALA y la subunidad 2 es la que se une en forma no covalente con la segunda molécula de ALA. Los contactos entre las subunidades, sitios A y B, pueden ser de diferentes tipos: interacciones iónicas o puentes de

hidrógeno entre tirosina y triptofano o grupos –SH; también se pueden formar enlaces covalentes entre los grupos –SH y el metal activador Zn. La posibilidad de otro tipo de interacciones como las hidrofóbicas, no pueden excluirse.

En la primera etapa (Figura II.6) se formaría el complejo integrado por las dos moléculas de ALA y las dos subunidades enzimáticas. Se formaría una base de Schiff entre el grupo carbonilo de la molécula de ALA (I) y un residuo de lisina de la subunidad I de la enzima; esta unión está facilitada por la proximidad de la histidina que transporta un protón desde el carbono- β del sustrato al centro hidrofóbico, estabilizando así el carbanión resultante y la base de Schiff. En la etapa inicial se producen interacciones entre el carboxilo y el amino terminales de las dos moléculas de sustrato y los residuos cargados negativamente en las subunidades.

Existen evidencias de que en el sitio activo del ALA-D hay dos grupos Cisteína, un átomo de Zn^{+2} , uno o dos residuos Lisina y uno o dos restos de Histidina (Battle & Stella, 1978; Jaffe et al., 1993), éstos son aminoácidos esenciales,

Los grupos histidina del centro activo están involucrados en la unión del zinc al sitio catalítico y el zinc protege a los grupos sulfhidrilos esenciales de la oxidación (Tsukamoto et al., 1979; Bevan et. al., 1980; Jaffe et. al., 1984; Fukuda et al., 1988).

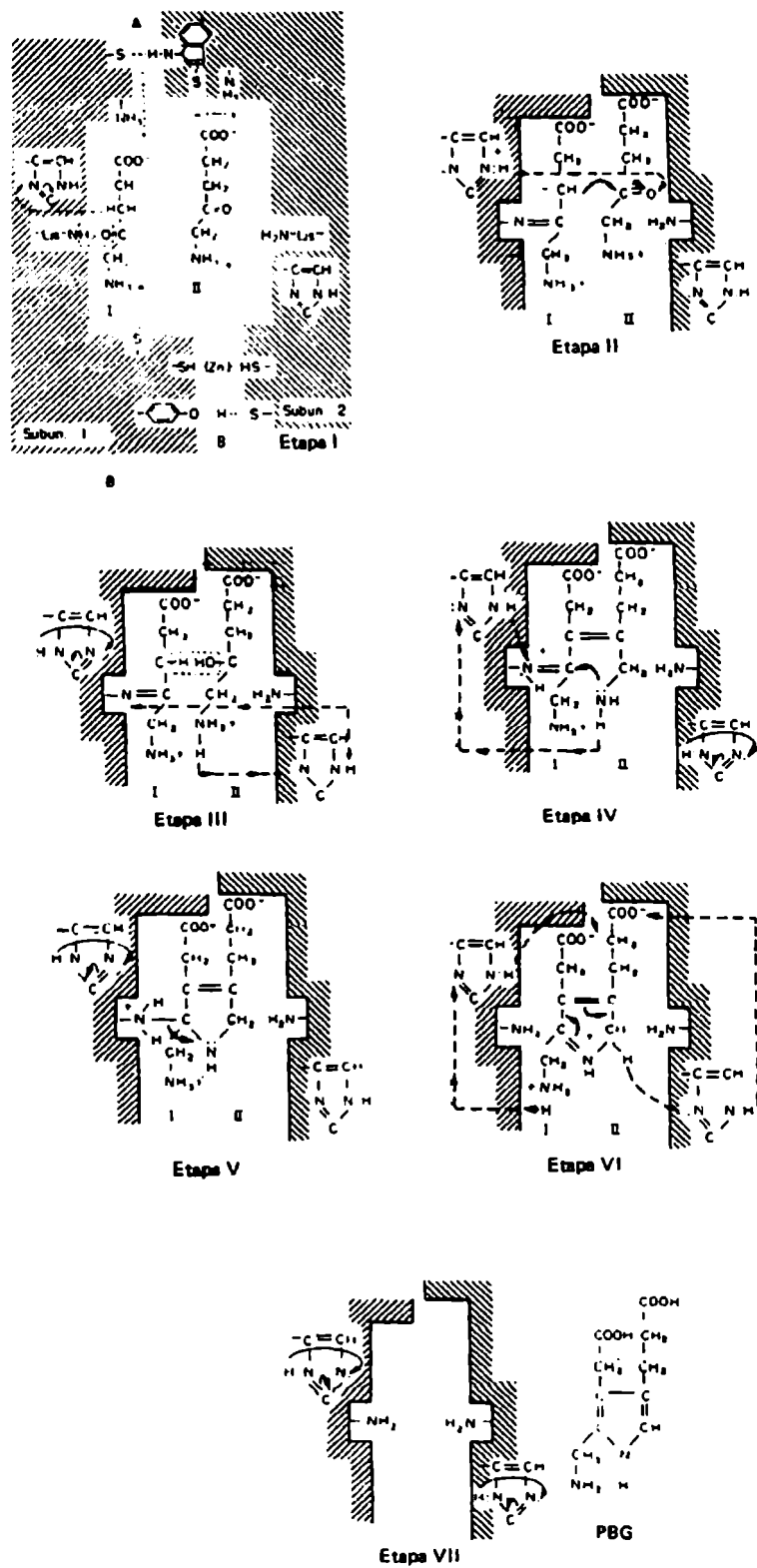


FIGURA II.6.: Mecanismo de acción del ALA-D.

El ALA-D de mamíferos contiene dos tipos de zinc uno catalítico (Zn_a) y otro no catalítico (Zn_b). Cada una de estas dos clases de Zn están presentes en un número de cuatro por octámero. Existen evidencias físicas y químicas que establecen los tipos de aminoácidos que actúan ligando estos iones metálicos. El Zn_a está pentacoordinado y tiene predominantemente como ligandos al oxígeno y al nitrógeno. Es esencial para la catálisis y se propone que está presente en los ALA-D de distintas especies. El Zn_b tiene un sitio de unión con 4 o por lo menos 2 cisteínas.

También se encontraron dos sitios de unión de metales llamados alfa y beta. El sitio alfa une un ión Zn^{2+} , el cual es esencial para la actividad catalítica. Este sitio puede utilizar también otros metales que pueden comportarse como ácidos de Lewis en el mecanismo de reacción, tales como Mg^{2+} o Co^{2+} . El sitio beta es exclusivo de metales de transición, se cree involucrado en la conformación proteica, y participa en la actividad catalítica cuando el Mg^{2+} está unido al sitio alfa. Estudios espectroscópicos con Co^{2+} permitieron encontrar tres residuos cisteína en el sitio beta y uno en el alfa. El ALA-D puede perder actividad, especialmente cuando está purificada, por exposición al aire y oxidación de los grupos sulfhidrilo (-SH) esenciales, por bloqueo de los grupos -SH con reactivos tales como iodoacetato, iodoacetamida; con metales pesados como el plomo o por tratamiento con ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Tanto los metales como el EDTA desplazan al Zn^{2+} del sitio activo

(Batlle et al., 1967). La inhibición de la enzima por el plomo (De Bruin, 1968) puede revertirse por calentamiento lo cual produce un reordenamiento de la estructura cuaternaria o por desplazamiento del metal con el agregado de compuestos sulfhidrúlicos como ditioneitol (DTT) y glutatión reducido (GSH) o de iones Zn^{2+} (Finelli et al., 1975; Sakai et al., 1980). El Cd^{2+} puede mimetizar el efecto protector atribuido al Zn^{2+} (Bevan et al., 1980). Además del efecto inhibitorio del plomo (Fowler et al., 1980), se ha encontrado que el platino (Maines & Kappas, 1977), oro (Eiseman & Alvarez, 1978), indio (Woods & Fowler, 1982), bismuto y galio (Fowler & Goering, 1986; Woods & Fowler, 1987) inhiben la actividad de esta enzima.

Mediante un estudio de inmunoanálisis específico para el ALA-D en líneas celulares híbridas roedor-humano, se ubicó el gen estructural codificante para esta enzima en el brazo largo del cromosoma 9 (Beaumont et al., 1984).

Wang et al. (1985) confirmaron la localización en la región 9q13→qter. El gen del ALA-D humano contiene 15.913 bp., con 2 exones no codificantes (1 A y 1 B) y 11 codificantes (2-12) (Kaya et al., 1994), correspondiente con una proteína de PM 36,274 kDa, y tiene una alta homogenicidad con la enzima de rata (Bishop et al., 1986).

El ALA-D tiene una expresión diferencial en las células eritroides y no eritroides. Se encontró que la expresión de los exones es semejante en todos los tejidos excepto por dos primeros exones 1 A y 1 B. Consecuentemente, mientras que la enzima es idéntica en todos los tejidos, el ARNm se presenta en una forma eritroidea específica (1 B) y en otra no eritroidea (1 A).

Por aislamiento del gen del ALA-D humano a partir de una librería específica del cromosoma 9 (ATCC #57781), y mediante una sonda de 350 pb (EcoR1-BamH1) del promotor del exon 1B de ratón se estudió el mapa de restricción (Figura II.7) (Bishop et al, 1986).

Las secuencias de aminoácidos del ALA-D provenientes de distintas especies tales como mamíferos, plantas, hongos, bacterias no fotosintéticas y bacterias fijadoras de nitrógeno tienen una alta conservación, con una identidad del 23 % y semejanza del 38 %, lo que sugiere que la estructura cuaternaria y el mecanismo de catálisis se ha conservado a través de la evolución. Además se ha confirmado la identidad inmunoquímica del ALA-D en diversos tejidos (Jaffé et al., 1995).

II.2.3. PORFOBILINOGENASA:

La PBGasa es un complejo formado por dos enzimas:

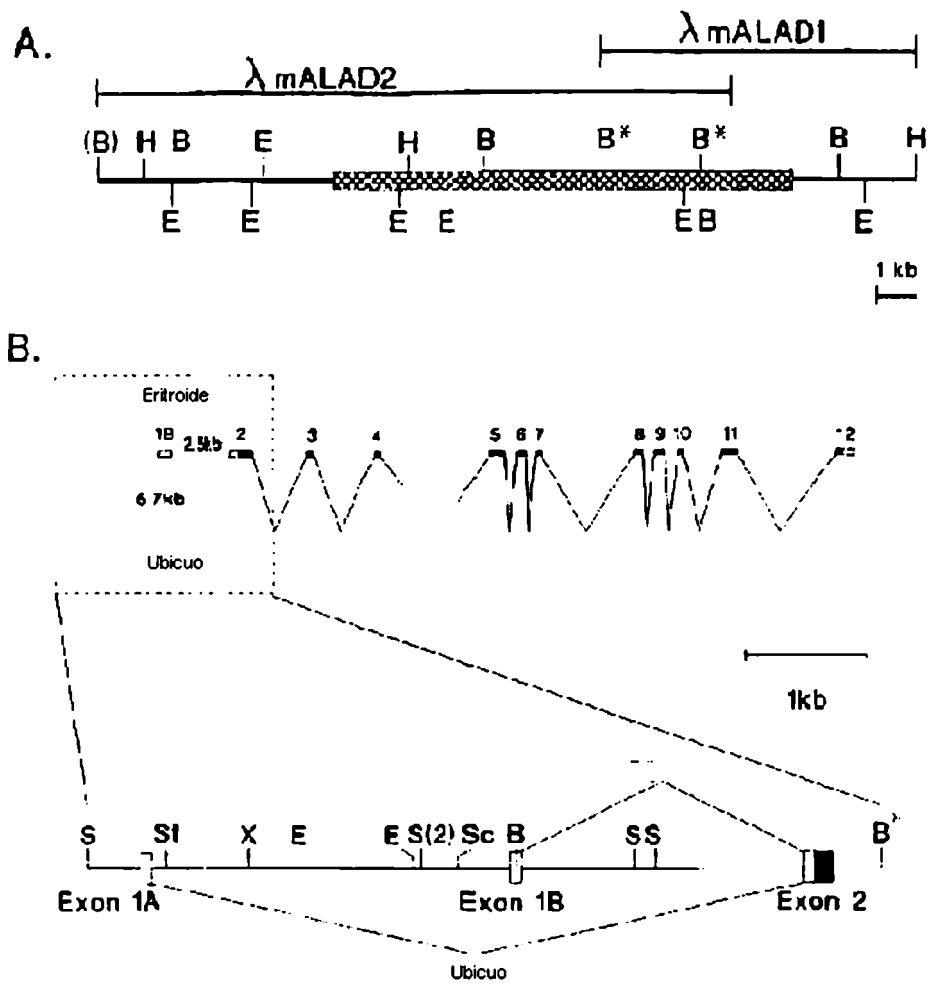


Figura II.7.: Estructura del gen del ALA-D. (A) Mapa de restricción del λ ALA-D1 y λ ALA-D2, diagramado en la dirección 5'-3'; B: *Bam* λ diHI; H: *Hind* III; y E: *Eco*R1. (B) Exón/intrón del ALA-D murino, ■ : codificante, □ : no codificante. La región exón 2 - 12 se muestra en escala en la línea superior; en la inferior se muestra la región de la izquierda.

1- Hidroximetilbilano sintetasa (HMB-S) o PBG deaminasa (PBG-D) (EC 4.3.1.8).

2- Uroporfirinógeno III sintetasa (Urogen III-S) (EC 4.2.1.75), o isomerasa o cosintetasa.

Ambas pueden diferenciarse por su susceptibilidad al calentamiento, siendo la deaminasa termoestable mientras que la Isomerasa no lo es.

La deaminasa cataliza la primer etapa de la reacción que consiste en la condensación, cabeza- cola, de 4 moléculas de PBG originando un intermediario polipirrólico inestable de cadena abierta, el 1-hidroximetilbilano (HMB) (Battersby *et al.*, 1979; Burton *et al.*, 1979, Scott *et al.* 1980).

Este tetrapirrol de cadena abierta tiende a ciclarse espontáneamente para dar Uroporfirinógeno I. Pero en presencia de la isomerasa, se invierte la orientación del anillo tetrapirrólico D, para generar el isómero asimétrico UROgen III (Jordan *et al.*, 1979). El UROgen III es el intermediario fisiológico en la biosíntesis del hemo, clorofilas y corrinas. Ni el PBG ni el UROgen I son sustratos de la Isomerasa (Warren & Scott, 1990). La concentración de Isomerasa, generalmente en exceso, determina la relación del UROgen de tipo III a tipo I formado. La importancia de esta enzima radica en que es la que genera la primer estructura tetrapirrólica.

Una deficiencia de PBG-D, lleva a una disminución en la síntesis de hemo y una acumulación de precursores y UROgen. Se ha propuesto que la PBG-D cumpliría un rol regulatorio secundario en la biosíntesis de porfirinas, ya que en ciertas condiciones su actividad puede resultar un paso limitante en la síntesis del hemo (Moore et al., 1980). La PBG-D se ha purificado tanto de organismos procariotas como de eucariotas incluyendo eritrocitos de pollo (Llambías et al., 1971), eritrocitos humanos (Anderson & Desnik, 1980; Fumagalli et al., 1985), hígado bovino (Sancovich et al., 1969b), callos de soya (Llambías & Batlle, 1971), *Euglena gracilis* (Williams et al., 1981; Rossetti et al., 1986), *Rhodopseudomonas sphaeroides* (Jordan & Shemin, 1973), *Rhodopseudomonas palustris* (Kotler et al., 1987), *Escherichia coli* (Thomas & Jordan, 1986), *Saccharomyces cerevisiae* (Correa García et al., 1991) y *Scenedesmus obliquus* (Juknat et al., 1994). También se aisló de plantas como espinaca (Higuchi & Bogorad, 1975) y arveja (Spano & Timko, 1991).

Según la fuente utilizada, su comportamiento cinético puede mostrar desde el típico perfil michaeliano hasta el clásico sigmoide que indica la presencia de por lo menos dos sitios de unión para el sustrato por molécula. Se ha observado también el fenómeno de cooperatividad negativa, sugiriendo en estos casos la existencia de un mecanismo de regulación por sustrato (Sancovich et al. 1969 b ; Llambías et al. 1970).

La fuerza iónica y la presencia de ciertos compuestos modifican el comportamiento de la Isomerasa (Sancovich *et al.*, 1969; Llambías & Batlle, 1971a, b; Batlle & Rossetti, 1977) lo cual indica que, dependiendo de las condiciones experimentales puede ocurrir una asociación de varias unidades de Isomerasa, lo que justificaría la variedad de pesos moleculares encontrados para esta enzima (Rossetti *et al.*, 1980). La isomerasa es fotosensible (Frydman & Frydman, 1974), se inactiva por agentes químicos que oxidan los residuos triptofano de la proteína.

Se han propuesto diversas hipótesis para explicar el mecanismo de reacción de la PBGasa, a partir de los estudios de esta enzima de callos de soya (Llambías & Batlle, 1970) se pudo determinar la existencia de intermediarios polipirrólicos de cadena abierta; confirmándose luego con los resultados obtenidos con la enzima de *Euglena gracilis* (Rossetti & Batlle, 1977), de *Rhodospseudomonas palustris* (Kotler *et al.*, 1987) y de *Saccharomyces cerevisiae* (Correa García *et al.*, 1995).

Estudios cinéticos han sugerido que la conversión de PBG en UROgen III o I ocurre en dos pasos, el primero consiste en la formación del intermediario polipirrólico y el segundo en la ciclación, produciéndose el Urogen correspondiente (Llambías & Batlle, 1971a; Rossetti & Batlle, 1977, Lander *et al.*, 1991) postulándose así el siguiente mecanismo (Figuras II.8 y II.9)

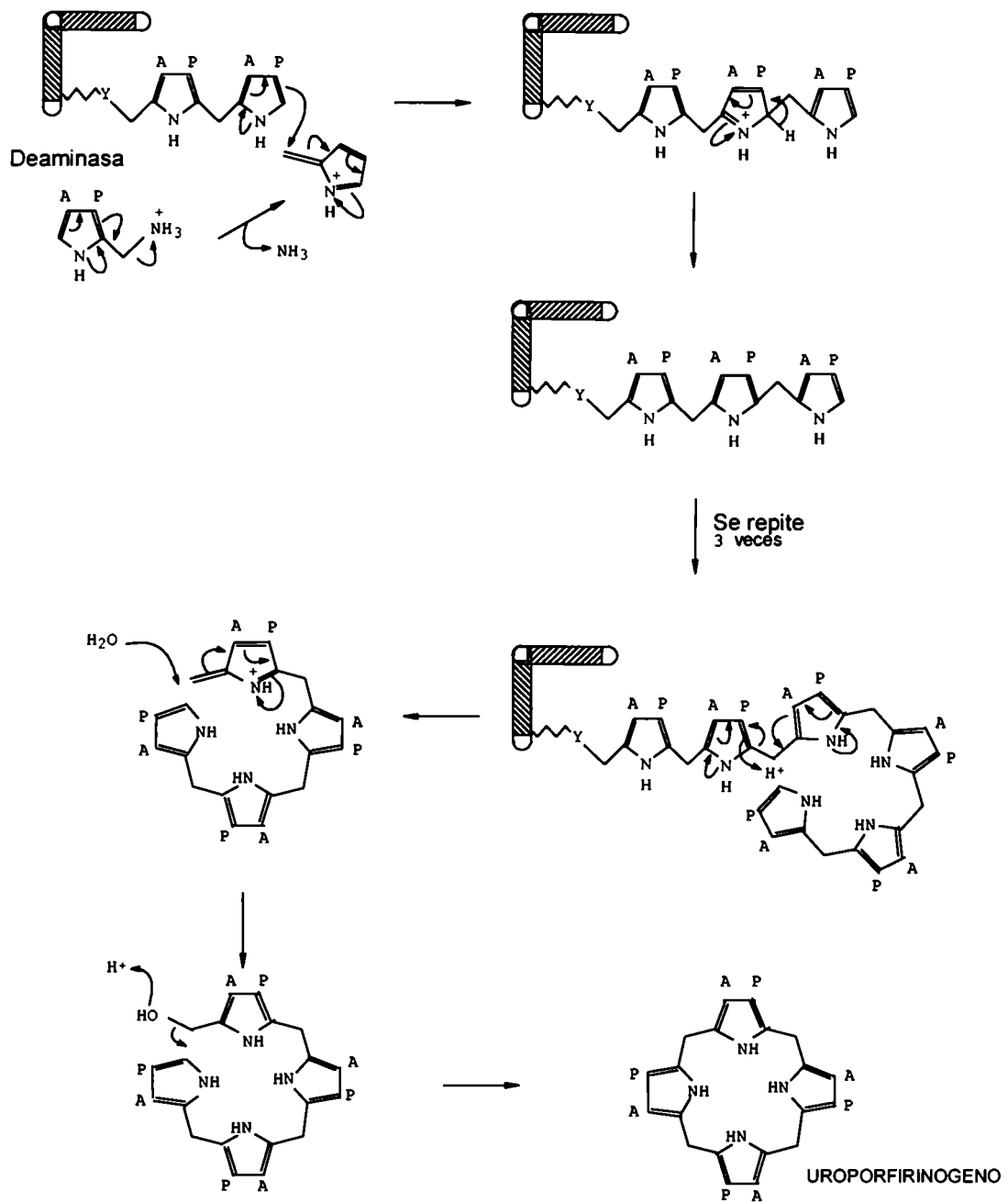


FIGURA II.8.: Mecanismo de formación del uroporfirinógeno I

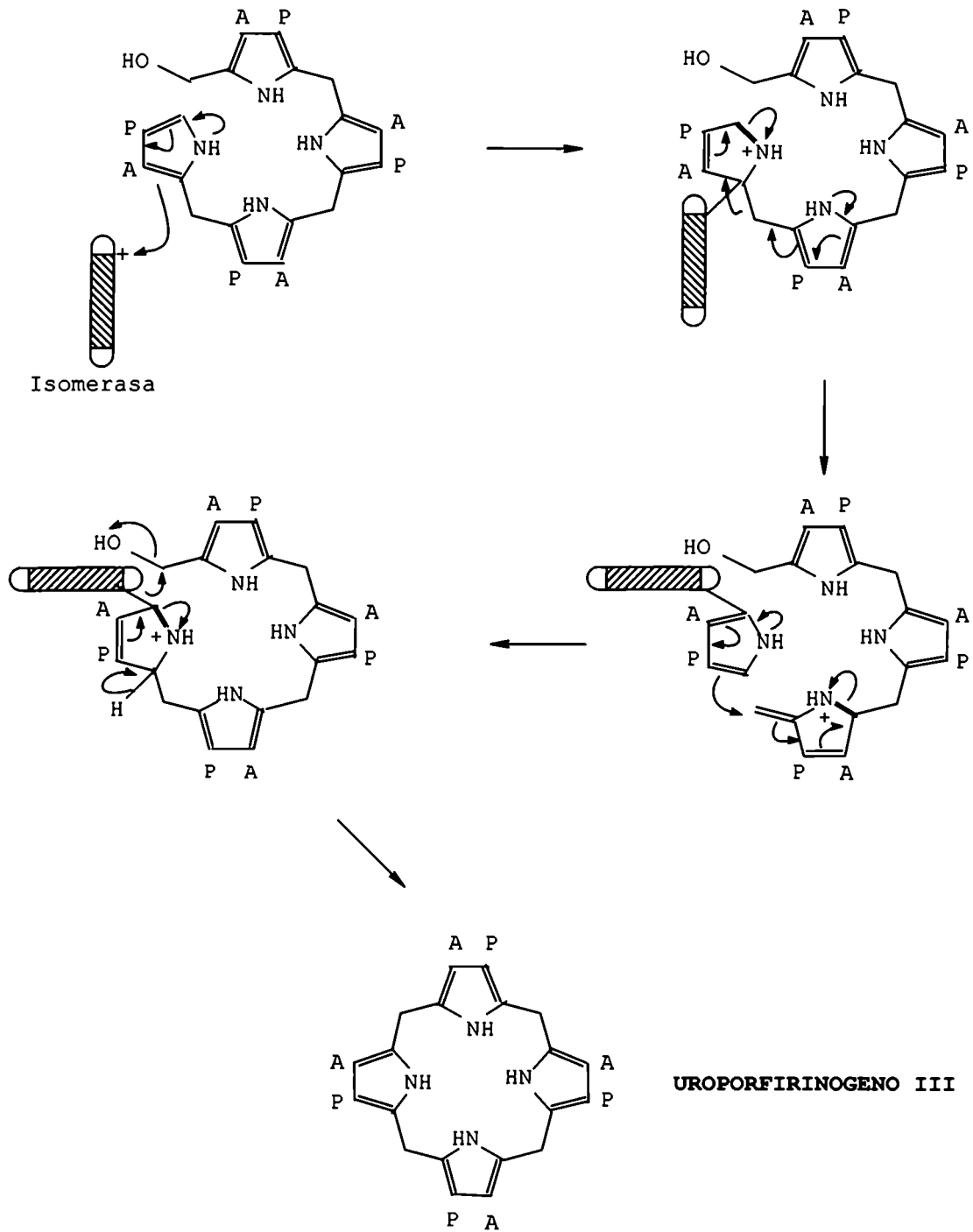


FIGURA II.9.: Mecanismo de formación del uroporfirinógeno III

Mediante estudios de hibridación (humano/ratón) se ubicó el gen que codifica para la PBG-D en el cromosoma 11 (Meisler et al, 1980). Posteriormente esta localización se restringió a las regiones 11q13-11qter y luego 11q23-11qter, (Wang et al., 1981; Meisler et al., 1981). A través del dosaje en la trisomía 11qter se localizó el mismo en la región 11q23.2-11qter (De Verneuil et al., 1982). Finalmente, los estudios de hibridación y dosaje de genes en pacientes con monosomía o trisomía de 11qter permitieron ubicar con mayor definición al gen en la región 11q24.1-11q24.2 (Namba et al., 1991).

Se han identificado dos formas moleculares distintas en células humanas: una isoforma ubicua de 44 kD y otra eritroide específica de 42 kD (Grandchamp & col, 1987). El análisis de los productos de traducción dirigidos por los ARNm's de bazo e hígado humanos demostraron que las dos isoformas estaban codificadas por ARNm's distintos y que la expresión del ARNm eritroide específico era exclusiva de células eritroides.

Los ADNc's que codifican las isoformas ubicua y eritroide específica se han clonado y secuenciado (Raich et al., 1986).

El ADNc eritroide tiene un marco de lectura abierto de 1.038 pb que codifican para 344 aminoácidos. El ADNc ubicuo posee 1.320 pb, con una identidad casi perfecta con el anterior, excepto el extremo 5' . Se

encontró un codón AUG adicional en fase, 52 pb “río arriba”(upstream) del codón de iniciación del ADNc no-eritropoyético. Así, la isoforma ubícuca posee 17 residuos aminoacídicos adicionales los que dan cuenta de su mayor PM (361 aminoácidos). Sin embargo, el análisis de Southern de los fragmentos de restricción del ADN genómico humano indicaron la existencia de un único gen que codifica para la PBG-D humana.

La Isomerasa humana se ha purificado hasta homogeneidad a partir de eritrocitos y se encontró que es una proteína monomérica de un PM aparente de 30 kDa (Tsai et al.,1987). Posteriormente, Tsai et al. (1988) aislaron, secuenciaron y expresaron en *E. coli* el ADNc que codifica para la Isomerasa humana. Este ADNc que codifica para los 265 aminoácidos que contiene la enzima, está compuesto por 1.269 pb y presenta en los extremos 5' y 3' no codificantes dos secuencias de 196 y 302 pb respectivamente.

Empleando este ADNc como sonda, el único gen que codifica para la Isomerasa de aproximadamente 60 kb, se ubicó en el brazo largo del cromosoma 10, siendo su localización 10q25.3→q26.3 (Astrin et al.,1991).

Por otro lado, se ha aislado también el ADNc que codifica para la Isomerasa de ratón (Bensidhoum et al., 1994; Xu et al., 1995). Este

ADNc tiene regiones 5' y 3' no-codificantes de 144 y 623 pb, respectivamente.

El gen se mapeó en el brazo corto del cromosoma 7, 7q25.3→q26.3. La comparación de las secuencias de aminoácidos del ADNc humano y de ratón reveló una identidad del 80,5% en nucleótidos y 77,8% en aminoácidos (Xu et al., 1995).

Es de interés mencionar aquí que todas las mutaciones conocidas en Porfiria Congénita Eritropoyética, excepto una (V28F) involucran aminoácidos conservados en las secuencias, humana y de ratón.

II.2.4. UROPORFIRINÓGENO DECARBOXILASA:

La Uro-D (E.C.4.1.1.37) es una enzima citosólica que ha sido estudiada en una amplia variedad de fuentes, entre ellas: *Chlorella* (Bogorad, 1958); *Rhodopseudomonas spheroides* (Hoare & Heath, 1958), eritrocitos humanos (Cornford, 1964), de conejo (Mauzerall & Granick, 1958) y de aves (Battle & Grinstein, 1964; San Martín de Viale & Grinstein, 1968; Tomio et al., 1970), hígado y eritrocitos humanos (Afonso et al., 1985), *Rp. palustris* (Koopman et al., 1986; Koopman & Battle, 1987), adenocarcinoma mamario de ratón (Navone et al., 1992).

La URO-D cataliza la conversión del UROgen al COPROgen; en esta reacción tiene lugar la decarboxilación secuencial de las cuatro cadenas laterales de ácido acético del sustrato a cuatro restos metilo, con la consiguiente liberación de cuatro moles de CO₂. Esta enzima decarboxila un gran número de porfirinógenos naturales o sintéticos, pero no decarboxila las correspondientes porfirinas (Smith et al., 1976). Si bien esta enzima actúa en forma muy específica sobre los restos acético, no ocurre lo mismo si se tiene en cuenta el tipo isomérico. Los isómeros de la serie III son decarboxilados más rápidamente, seguidos en orden decreciente de velocidad por los isómeros de las series IV, II y I (Granick & Mauzerall, 1958; Cornford 1964; San Martín de Viale & Grinstein, 1968; Smith & Francis, 1981).

De las propiedades cinéticas de la enzima, se ha propuesto que la reacción de decarboxilación ocurre en dos etapas, la primera de ellas involucra una rápida pérdida del primer grupo carboxilo en el anillo D del Urogen III seguido por una eliminación más lenta de los restantes residuos acetilo de los anillos A, B y C (Mauzerall & Granick, 1958; Batlle & Grinstein, 1964, Tomio et al., 1970; Kardish & Woods, 1980).

La actividad de la URO-D es inhibida por compuestos tales como mercurio, cobre, hierro (Koopmann & Batlle, 1987), iodoacetamida y p-cloromercuribenzoato (Tomio et al., 1970; Romeo & Levin, 1971), entre otros.

Esta inhibición puede ser revertida por el agregado de glutatión reducido (GSH) (Mauzerall & Granick, 1958; Tomio et al., 1970; Koopmann & Batlle, 1987), indicando que la URO-D es una enzima sulfhidrúlica. Entre los residuos del sitio activo esenciales para su actividad, se encuentran grupos tioles e histidinas.

Es una enzima preferentemente anaeróbica; el oxígeno inhibe su actividad en forma significativa.

En la Porfiria cutánea tardía (PCT) hereditaria, se encuentra una deficiencia de URO-D en sangre y en el hígado (Afonso et al., 1985) mientras que su actividad en sangre es normal en la PCT adquirida.

La actividad disminuída de la enzima produce una acumulación masiva y/o un aumento en la excreción de porfirinas altamente carboxiladas, que son las responsables de la fotosensibilización que caracteriza a la PCT y a la Porfiria hepato eritropoyética (PHE).

La presencia de porfirinas heptacarboxílicas, como la firiaporfirina, en la orina de pacientes con actividad de URO-D hepática disminuída, sugiere la formación de un porfirinógeno heptacarboxílico como intermediario en la decarboxilación enzimática de uroporfirinógeno III a coproporfirinógeno III. La reacción ocurre en dos etapas: una rápida y una lenta (Figura II. 10).

La etapa inicial, rápida, involucra la decarboxilación del anillo D del UROgen, seguida de una más lenta que involucra la decarboxilación del resto de los residuos carboxílicos en el orden anteriormente citado, esta secuencia tiene lugar con todos los isómeros del sustrato. De este modo se explica la existencia de intermediarios decarboxilados.

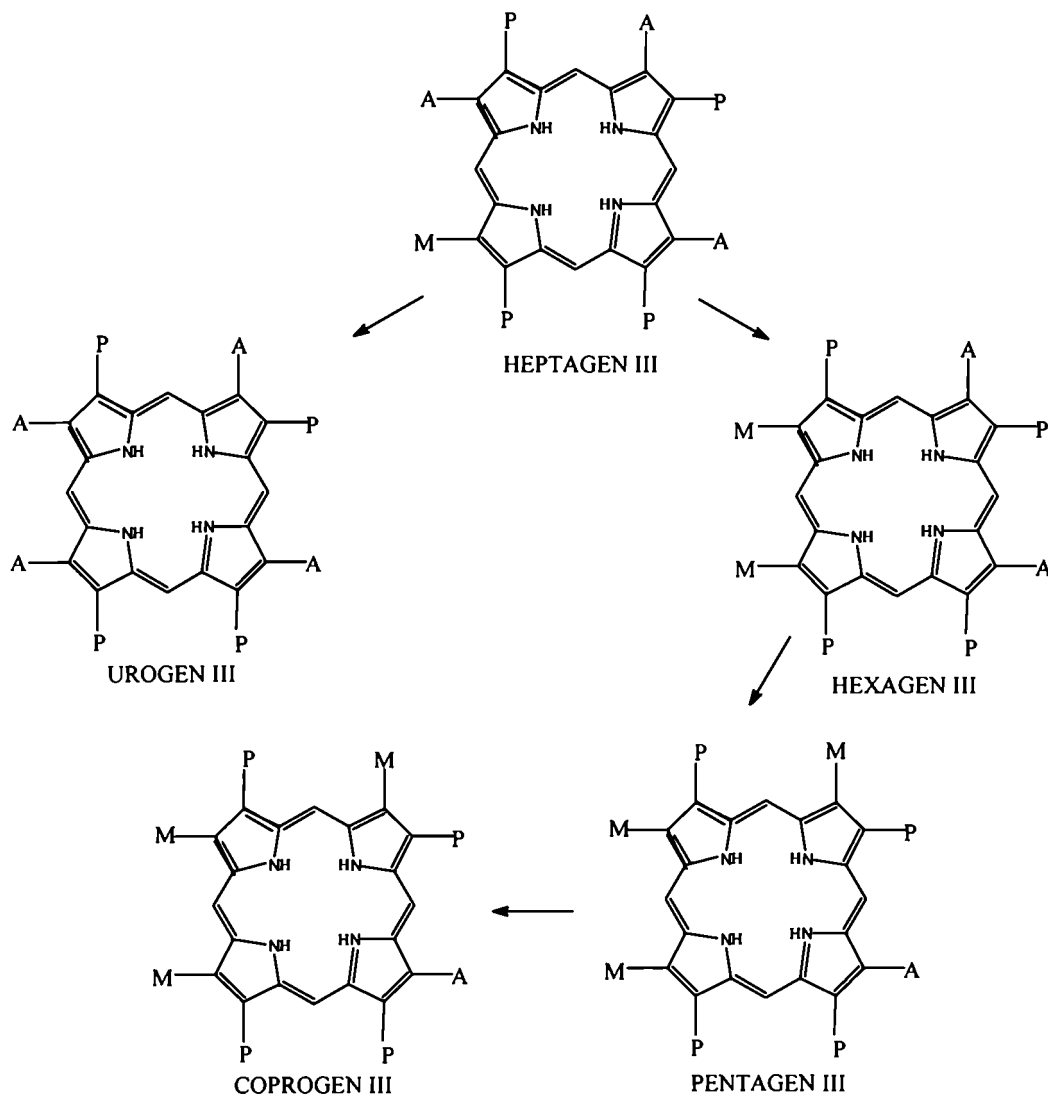


FIGURA II.10.: Formación de COPROgen III a partir de UROgen III.

La URO-D humana está codificada por un único gen housekeeping que mapea en el brazo corto del cromosoma 1 (1p34) (Dubart et al., 1986).

El ADNc de la URO-D humana fue clonado y secuenciado por Roméo et al. (1986), demostrando que el ARNm tiene una longitud de 1.197 bases y codifica para un polipéptido de 367 aminoácidos. La estructura del gen fue determinada por Romana et al., (1987); está compuesto por 10 exones dentro de una extensión de aproximadamente 3 kb; los exones tienen entre 20 y 162 pb mientras que la longitud de los intrones varía entre 70 y 740 pb.

Presenta dos sitios de inicio de transcripción: uno ubicado 12 bases "upstream" del codón ATG iniciador de la traducción del cual parten el 90% de las transcritos y el otro, está 6 pb "upstream" de éste. Ambos sitios se encuentran en todos los tejidos en iguales proporciones. El ADNc descrito por Romeo et al. (1986) corresponde al ARNm iniciado en el segundo sitio de transcripción. Posee una región 3' no codificante de 75 pb con una secuencia de poliadenilación (5'AATAAA3') a 19 pb "downstream" del extremo 3'. En la región 5' no codificante se identificaron una pseudo TATA box (5'TTAAATT3') localizada a -21 del sitio principal de inicio de transcripción y una GC box (5'GGGGCGGAGC3') en la posición -60 que a diferencia de lo que ocurre en numerosos promotores de genes housekeeping sólo hay una de estas secuencias; además es interesante el hecho de que no posee CAAT box a menos que la secuencia ubicada a

-80 (5'CCAAG3') pueda cumplir la misma función. No se observaron diferencias de tamaño ni secuencia en el ARNm que pudieran suponer la posibilidad de splicing alternativo entre células eritroides y no eritroides. Sin embargo los niveles de ARNm son más altos en células eritroides que en no eritroides lo cual sugiere la existencia de regulación diferencial en la expresión.

En 1996, Morán et al. (1996) publicaron la secuencia completa del gen que codifica para la URO-D humana mediante sucesivos subclonados del clon original que contenía la URO-D y secuenciación directa, confirmándose la estructura del gen determinado por Romana et al. (1987). Se identificaron 2 sitios de inicio de la transcripción en las posiciones -12 y -18 del codón de iniciación de la traducción ATG, originando así una región corta no-codificante en el ARNm como ya habían descrito Romana et al. (1987) igualmente que las TATA y GC box en la región 5' no-codificante que, según Morán et al. (1996) son dos secuencias consenso usualmente presentes en los promotores de genes housekeeping.

II.2.5. COPROPORFIRINOGENASA:

La CPG-asa cataliza la conversión de COPROgen III en PROTOgen IX. La reacción involucra la decarboxilación oxidativa de dos grupos propiónicos en los anillos A y B del núcleo tetrapirrólico del COPROgen a dos residuos vinilo, para formar el PROTOgen IX.

La enzima fue detectada en numerosas fuentes, pero la mayor información sobre sus propiedades proviene de trabajos realizados con la enzima purificada de mitocondrias de hígado de rata. (Batlle et.al, 1965).

La CPG-asa es una enzima ubicada en la mitocondria (Sano & Granick, 1961; Batlle et al.,1965). Es altamente específica para el isómero fisiológico III pero también puede actuar sobre el isómero IV (Porra & Falk, 1964).

Requiere la presencia de oxígeno molecular para su actividad en cuyo caso ningún otro aceptor de electrones puede reemplazarlo, si bien existe una CPGasa anaeróbica para la cual funciona otro sistema aceptor de electrones (Poulson & Poglase, 1974).

Es una enzima monomérica con un PM de 80 kDa (Batlle et al., 1965; Poulson & Poglase, 1974; Yoshinaga & Sano, 1980).

El estudio de su estructura primaria indicó que es una proteína rica en residuos aromáticos. Su actividad no se altera significativamente cuando están presentes reactivos sulfhidrúlicos.

La reacción catalizada por la CPG-asa tiene lugar en etapas (Figura II.11).

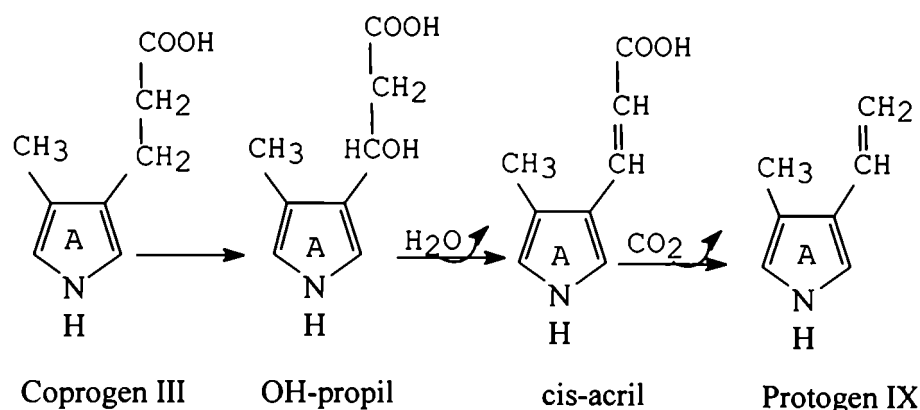


FIGURA II.11.: Decarboxilación del Coproporfinógeno III a Protoporfinógeno IX.

Durante esta reacción se detectó un intermediario tricarbóxico (harderoporfirina) que desaparece a medida que aquella progresa. La decarboxilación de los residuos propiónicos es independiente y secuencial, y comienza en el carbono β de la cadena lateral del anillo A, siguiendo por el del anillo B. La pérdida de uno de los átomos de hidrógeno es estereoespecífica (Zaman et al., 1972). Batlle & Rimington (1965) propusieron que las cadenas de ácido propiónico son convertidas en ácido β -hidroxipropiónico. La deshidratación de estos residuos produce ácido acrílico, probablemente el isómero cis, y su decarboxilación conduce a la formación de los grupos vinilo (Batlle & Rimington, 1965; Sano, 1966).

Taketani y col. (1994) aislaron a partir de un banco de ADNc de placenta humana un clon conteniendo el ADNc que codifica para la CPGasa humana empleando un fragmento marcado del ADNc de la

CPGasa de ratón. Este ADNc tenía un marco de lectura abierto de 1.062 pb y codificaba para una proteína de 354 aminoácidos. La proteína madura tiene 323 residuos aminoacídicos con una pre secuencia de 31 aminoácidos.

Los estudios de Northern blot indicaron que el ARNm de células eritroides es el mismo que el de células no-eritroides.

Delfau-Larue et al. (1994) clonaron el DNA genómico de la CPGasa con el objetivo de facilitar la caracterización de la estructura de la enzima, determinar los defectos moleculares en la CPGasa, estudiar el rol de la CPGasa en la regulación del camino biosintético del hemo y obtener información sobre la organización y regulación del gen. Para ello los autores purificaron la CPGasa de ratón, fabricaron una sonda de ADNc en base a las secuencias N-terminal y peptídica interna de la enzima de ratón y la usaron para aislar de un banco de ADNc humano , un ADNc que codifica para una proteína madura de 344 aminoácidos. Su expresión en *E. coli* dio una actividad 17 veces mayor que la actividad endógena. Luego aislaron los clones genómicos conteniendo el gen de la CPGasa humana; su secuenciación indicó que el gen de la CPGasa abarca 14 kb y comprende 7 exones y 6 intrones. Se determinaron las secuencias para todos los exones, uniones exón/intrón y la región promotora de 800 pb. El gen se mapeó en el brazo largo del cromosoma 3, asignándole la localización 3q12. El tamaño de los intrones varía

desde 269 pb hasta 5 kb y todos tienen las secuencias consenso de splicing en sus extremos. Los estudios realizados revelaron la presencia de múltiples sitios de iniciación en una región con secuencias características de un promotor. La región promotora es rica en GC y contiene múltiples elementos Sp1, cajas CACCC y sitios potenciales de una unión GATA-1 (Delfau-Larue et al., 1994).

II.2.6. PROTOPORFIRINOGENO-OXIDASA:

La PPGox cataliza la conversión del PROTOgen IX en PROTO IX, con la eliminación de 6 átomos de hidrógeno.

Esta enzima ha sido identificada en numerosas fuentes (Poulson & Poglase, 1975; Poulson, 1976; Jackson et al., 1978; Brenner & Bloomer, 1980) y requiere oxígeno como único aceptor de hidrógeno aunque en *Escherichia coli*, fumarato y nitrato pueden reemplazar al oxígeno bajo condiciones anaeróbicas (Jacobs & Jacobs, 1975).

La PPGox es una enzima mitocondrial y ubicada en la membrana interna de la organela (Deybach et al., 1985). Es altamente específica para el PROTOgen IX, termolábil y sulfhidrónica.

El PM de la enzima de hígado de rata, de hígado humano y de levaduras es de 35, 32 y 180 kDa respectivamente (Poulson & Poglase, 1975; Poulson, 1976).

Su mecanismo de acción no ha sido totalmente esclarecido, sin embargo se ha postulado que los grupos sulfhidrilos del sitio activo serían importantes para la unión del sustrato a través de los residuos vinilo (Jackson & Games, 1975). El grupo de Jackson demostró además que el proceso de oxidación es estereoespecífico. Se produce la pérdida de los átomos de hidrógeno ubicados en sólo uno de los lados del plano de la porfirina.

En 1995, Nishimura et al. clonaron el gen que codifica para la PPGox humana por complementación *in vivo* de una mutante de *E. coli*, hemG, deficiente en PPGox y por lo tanto deficiente en la respiración aeróbica al no poder sintetizar citocromos, creciendo pobremente aún en medios enriquecidos. Por complementación con un banco de ADNc de placenta humana, aislaron un clon que incrementaba el crecimiento de la mutante. Dicho clon codificaba para el gen de la PPGox y el análisis de su secuencia reveló que la PPGox contiene 477 aminoácidos con un PM de 50,8 kDa. El extremo N-terminal contiene una secuencia conservada de aminoácidos que forma un sitio de unión para un dinucleótido como el que se encuentra en proteínas asociadas a flavinas. El análisis de Northern blot reveló la síntesis de un ARNm de 1,8 kb para la PPGoxasa.

Además la proteína se sintetiza con una presecuencia requerida para su "targeting" e ingreso a la mitocondria como ocurre con las otras dos enzimas mitocondriales que catalizan los últimos pasos de la biosíntesis del hemo, CPGasa y Fequel.

La secuencia del ADNc tiene una longitud de 1.814 pb y contiene un marco de lectura abierto de 1.431 (Nishimura et al., 1995) que codifica para una proteína de 477 residuos aminoacídicos con un PM de 50,85 kD. La proteína expresada en *E. coli* es sensible a la inhibición por el herbicida acifluoreno y se encontró asociada a la fracción particulada de la célula. Con respecto a la ubicación cromosómica de la PPGox, Bissbort et al. (1988) estudiaron 23 familias africanas diagnosticadas como PV en base a los siguientes criterios: i) un cuadro clínico positivo de PV; ii) ensayos bioquímicos positivos en orina, sangre y materia fecal, patrones de excreción típicos de una PV y iii) una historia familiar de PV. Este último requisito se consideró fundamental, a pesar de ello, pocos pacientes cumplieron los dos primeros criterios, demostrando así la penetrancia incompleta de la enfermedad. Los autores realizaron estudios de ligamiento empleando marcadores clásicos que se expresan en suero y en eritrocitos y en base a estos estudios se ubicó el gen de la PPGox en el brazo largo del cromosoma 14.

Recientemente, y en discrepancia a lo descrito por Bissbort et al. (1988), Taketani et al. (1995) empleando la técnica de hibridación de

fluorescencia *in situ* (FISH) mapearon el gen que codifica la PPGox en el cromosoma 1, asignándole la región 1q22. Si bien, la diferencia parece inexplicable, sería probable según los autores que algún producto codificado por el cromosoma 14 pueda interactuar con la proteína PPGox para mantener una actividad normal de la enzima o pueda afectar la expresión del gen de la PPGox. De todos modos, el análisis molecular del gen de la PPGox en pacientes con PV podría resolver esta discrepancia.

II.2.7. FERROQUELATASA:

El último paso de la ruta biosintética del hemo es la inserción de un átomo de hierro (II) en la PROTO IX. Esta reacción es catalizada por la Fequel (EC 4.99.1.1) (Rimington, 1958), y puede ocurrir también en ausencia de enzima.

Se ha estudiado en numerosas fuentes, entre ellas: *Saccharomyces cerevisiae* (Porra & Jones, 1963), hígado de rata (Porra & Jones, 1963) y cerdo (Jones & Jones, 1970), eritrocitos de ave (Hanson & Dailey, 1984) y *Trypanosoma cruzi* (Salzman & Batlle, 1986).

La Fequel es una enzima mitocondrial de naturaleza lipoproteica localizada en la membrana interna de la mitocondria (Mc Kay et al., 1969).

El agregado de fracciones fosfolipídicas o de ciertos solventes aumenta su actividad, probablemente facilitando el acceso del sustrato al sitio activo.

Es específica para hierro en estado ferroso. La afinidad de la enzima por el hierro se incrementa por tratamiento con hexaclorobenceno debido a la modificación de la configuración que da una mayor exposición del sitio activo (Ríos de Molina et al., 1989). Otras porfirinas además de la PROTO IX pueden actuar como sustrato, entre ellas tenemos a la meso y a la deuteroporfirina, pero no sus correspondientes porfirinógenos (Porra & Jones, 1963; Jones & Jones, 1969). Se propone que el fosfato de piridoxal es un cofactor de la enzima, y que estaría involucrado con el sitio de unión del Fe^{2+} o al menos en el acercamiento del Fe^{2+} al sitio activo de la enzima (Ríos de Molina et al., 1991).

Esta enzima es sulfhidrónica y se inactiva significativamente por plomo (Moore et al., 1979). Metales como el Cu^{+2} y Co^{+2} no la afectan, mientras que Mn^{+2} y Mg^{+2} son también inhibidores, y cuando el Cu^{+2} actúa en presencia de Fe^{+2} se convierte en un fuerte inhibidor (Dailey, 1984; Hanson et al., 1984; Dailey et al., 1986; Salzman & Batlle, 1986).

El ADNc que codifica para la Fequel humana se aisló a partir de un banco de ADNc de placenta humana empleando como sonda un fragmento de ADNc de la enzima de ratón marcado radioactivamente

(Nakahashi et al.,1990). El ADNc tiene un marco de lectura abierto de 1269 pb y codifica 423 aminoácidos con señales alternativas de poliadenilación en el extremo 3' no-codificante y colas poli(A). La secuencia de aminoácidos mostró que la proteína madura contiene 369 residuos aminoacídicos con una presecuencia de 54 aminoácidos. La Fequel humana mostró un 88% de identidad con la enzima de ratón y un 46% con la de levadura, encontrándose mayor grado de conservación en la región carboxi-terminal con respecto a la región amino-terminal. Así los tres péptidos ubicados en las regiones: 259 a 267, 295 a 303 y 334 a 345 son los mismos en las tres especies, sugiriendo que las secuencias de aminoácidos en estas regiones estarían probablemente muy involucradas en la función catalítica de la enzima. En 1992 Taketani et al., empleando la técnica de fluorescencia de hibridación "*in situ*", mapearon el gen que codifica para la Fequel en el cromosoma 18 asignándolo a la región q21.3.

II.3. BIBLIOGRAFIA

AFONSO, S. G.; CHINARRO, S.; STELLA, A.M.; LENCZNER, M. y MAGNIN, P.: Uroporfirinógeno decarboxilasa eritrocitaria y hepática en Porfiria Cutánea Tardía. Rev. Arg. Derm. 66, 12-24, 1985.

AKHTAR, M.; ABOUD, M.; BARNARD, G.; JORDAN, P. & ZAMAN, Z.: Mechanism and stereochemistry of enzymic reactions involved in porphyrin biosynthesis. Phil. Trans. R. Soc., Lond. (Biol.), B, 173, 117-136, 1976.

ANDERSON, P.M. & DESNICK, R.: Purification and properties of Uroporphyrinogen I synthase from human erythrocytes. Identification of stable enzyme substrate intermediates J. Biol. Chem., 255, 1983-1999, 1980.

ASTRIN, K.H.; WARNER, C.A.; YOO, H.W.; GOODFELLOW, P.J.; TSAI, S.F. & DESNICK, R.J.: Regional assignment of the human uroporphyrinogen III synthase (URO-S) gene to chromosome 10q25.2→q26.3, Hum. Genet., 87, 18-22, 1991.

BAJKOWSKI, A. & FRIEDMANN, H.: 5-Aminolevulinic acid formation. Purification and properties of alanine; 4,5-dioxovalerate aminotransferase and isolation of 4,5-dioxovalerate from *Clostridium tetanomorphum*. J. Biol. Chem., 257; 2207-2215, 1982.

BATLLE, A. M. del C. y RIMINGTON, C.: Estudios sobre la síntesis de la diacrílicodeuteroporfirina IX, un posible intermediario en la biosíntesis de protoporfirina IX. *Ciencia Inv*, 22; 369-373, 1965.

BATLLE, A. M. del C. & ROSSETTI, M.V.: Enzymic polymerization of porphobilinogen into uroporphyrinogens, *Int. J. Biochem.*, 8, 251-267, 1977.

BATLLE, A.M del C. & STELLA, A.M.: 5-aminolaevulinate dehydratase: its mechanism of action. *Int. J. Biochem.*, 9, 861-864, 1978.

BATLLE, A. M. del C.; FERRAMOLA, A. y GRINSTEIN, M.: Purification and general properties of delta aminolaevulinic acid dehydratase from cow liver. *Biochem.J.*, 104; 244-249, 1967.

BATLLE, A.M. del C.; BENSON, A. & RIMINGTON, C.: Purification and properties of coproporphyrinogenase. *Biochem.J.*, 97, 731-740, 1965.

BATLLE, A.M. del C. & GRINSTEIN, M.: Porphyrin biosynthesis I. Studies on erythrocytes preparations, *Biochim. Biophys. Acta*, 82, 1-12, 1964.

BATLLE, A.M.del C. & GRINSTEIN, M.: Porphyrin biosynthesis II. Phylloporphyrinogen III, a normal intermediate in the biosynthesis of Protoporphyrin IX, *Biochim. Biophys. Acta*, 82, 13-20, 1964.

BATTERSBY, A.R., FOOKES, C.J.R., GUSTAFSON-POTTER, K.E., MATCHAM, G.W.J. & MC DONALD, E. Proof by synthesis that unrearranged hydroxymethylbilane is the product from deaminase and the substrate for cosynthetase in the biosynthesis of Urogen-III. *J.Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1155-1158, 1979.

BEALE, S. I. & CASTELFRANCO, P. A.: The biosynthesis of 5-aminolaevulinic acid in high plants. II. Formation of 14 C-aminolaevulinic acid from labeled precursors in greening plant tissues, *Plant Physiol.*, 53, 297-303, 1974.

BEAUMONT, C.; FOUBERT, C.; GRANDCHAMP, B.; WEIL, D.; VAN CONG N'GUYEN; GROSS, M.S. & NORDMANN, Y.: Assignment of the human gene for delta aminolevulinic acid dehydratase to chromosome 9 by somatic cell hybridization and specific enzyme immunoassay, *Ann.Hum. Genet.*, 48, 153-159, 1984.

BENSIDHOUM, H.; GED, C.M.; POIRIER, C.; GUENET, J.L. & DE VERNEUIL, H.: The cDNA sequence of mouse uroporphyrinogen III synthase and assignment to mouse chromosome 7, *Mamm. Genome*, 5, 728-730, 1994.

BERMUDEZ MORETTI, M.; CORREA GARCÍA, S.; STELLA, C.; RAMOS, E. & BATLLE, A.M. del C.: Delta aminolevulinic acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Biochem.*, 25, 12; 1917-1924, 1993.

BEVAN, D.R.; BOLDLANDER, P. & SHEMIN, D.: Mechanism of porphobilinogen synthase: Requirement of Zinc for enzyme activity, *J. Biol. Chem.*, 255, 2030-2035, 1980.

BISHOP, T.R.; FRELIN, L.P. & BOYER, S.H.: Nucleotide sequence of rat liver δ -aminolevulinic acid dehydratase cDNA. *Nucleic Acids Res.*, 14; 10115-10124, 1986.

BISSBORT, S.; HITZCROTH, H.W.; DUWENTZEL, D.P.; VAN DEN BERG, C.W.; SEUFF, H.; WIENKER, T.F. & BENDER, K.: Linkage between the variegate porphyria (VP) and the α -1-antitrypsin (PI) genes on human chromosome 14, *Human Genet.*, 79, 289-290, 1988.

BOTTOMLEY, S. & SMITHEE, G.: Characterization and measurement of δ -aminolevulinic acid synthetase in bone marrow cell mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*; 159, 27-37, 1968.

BRENNER, D.A. & BLOOMER, J.R.: The enzymic defect in variegate porphyria. Studies with human cultured skin fibroblast, *N. Engl. J. Med.*, 302, 765-769, 1980.

BURTON, G., FAGERNESS, P.E., HOSOZAWA, S., JORDAN, P.M., SCOTT, A.I.: Evidence for a new intermediate, preuroporphyrinogen, in the enzymic transformation of porphobilinogen into uroporphyrinogens I and III. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 202-204, 1979.

COOKSON, G.H. & RIMINGTON, C.: Porphobilinogen. *Biochem. J.*, 57, 476-478, 1954.

CORNFORD, P.: Transformation of porphobilinogen into porphyrins by preparations from human erythrocytes, *Biochem. J.*, 91, 64-73, 1964.

CORREA GARCÍA, S.R.; ROSSETTI, M.V. & BATLLE, A.: Different porphobilinogen-deaminase forms in wild and mutants strains of *Saccharomyces cerevisiae*. A possible correlation with its segregant behaviour, *Int.J. Biochem.*, 23, 1019-1023, 1991.

CORREA GARCIA, S; BERMUDEZ MORETTI, M.; CARDALDA, C.; ROSSETTI, M.V. & BATLLE, A.M.: The role of ALA-S and ALA-D in regulating porphyrin biosynthesis in a normal and a HEM R⁺ mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.*, 9, 165-73, 1993.

DAILEY, H. A.: Effect of sulfhydryl modification on the activity of bovine ferrochelatase, *J. Biol. Chem.*, 259, 2711-2715, 1984.

DAILEY, H. Y.; FLEMING, J.E. & HARBIN, B.M.: Ferrochelatase from *Rp. sphaeroides*; Substrate specificity and role of sulfhydryl and arginyl residues, *J. Bacteriol.*, 165, 1-5, 1986.

DE BONIS, A.; ROSSETTI, M. & BATLLE, A.: Aminolevulinic acid Dehydratase from *Rhizobium*, *Int. J. Biochem.*, 24, 1041-1046, 1992.

DE BRUIN, A.: Effect of lead exposure on the level of δ -aminolevulinic dehydratase activity. *Med. Lav.*, 59, 411-418, 1968.

DELAUNAY, A.M.; HUAULT, C. & BALANGE, A.P.: Molecular cloning of the 5-aminolevulinic acid dehydratase gene from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.*, 173, 2712-2715, 1991.

DELFAU-LARUE, M.H.; MARTASEK, P. & GRANDCHAMP, B.: Coproporphyrinogen oxidase gene organization and description of a mutation leading to exon 6 skipping, *Hum. Mol. Genet.*, 3 (8), 1325-1330, 1994.

DE VERNEUIL, H.; GRANDCHAMP, B. & NORDMANN, Y.: Some kinetic properties of human red cell uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta.* 611, 174-186, 1980.

DE VERNEUIL, H.; PHUNG, N.L.; NORDMANN, Y.; ALLARD, D.; LEPRINCE, F.; JEROME, H.; AURIAS, A. & RETHORE, M.O.: Assignment of human uroporphyrinogen I synthase locus to region 11q.ter by gene dosage effect, *Hum. Genet.*, 60, 212-213, 1982.

DEYBACH, J.C.; DA SILVA, V.; GRANDCHAMP, B. & NORDMANN, Y.: The mitochondrial location of Protoporphyrinogen oxidase, *Eur. J. Biochem.*, 149, 431-435, 1985.

DIERKS, P.: Molecular biology of eukaryotic 5-aminolevulinic synthase. en Dailey, H. Ed. Biosynthesis of heme and chlorophylls. New York, Mc Graw- Hill, 201-233, 1990.

DRESEL, E.I.B. & FALK, J.E.: Conversion of δ -aminolaevulinic acid to porphobilinogen in a tissue system. *Nature*, 172, 1185-1187, 1953.

DUBART, A.; MATTEI, M.G.; RAICH, N.; BEAUPAIN, D.; ROMÉO, P. H.; MATTEI, J.F. & GOOSSENS, M.: Assignment of human uroporphyrinogen decarboxylase (URO-D) to the p34 band of chromosome 1, *Hum. Genet.*, 73, 277-279, 1986.

EISEMAN, J. & ALVAREZ, A.: Alterations induced in heme pathway enzymes and monooxygenases by gold. *Molec. Pharmacol.*, 14, 1176-1183, 1978.

FINELLI, V.N.; KLAUDER, D.S.; KARAFFA, M.A. & PETERING, H.G.: Interaction of zinc and lead on δ -aminolevulinic dehydratase, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 65, 303-311, 1975.

FOWLER, B.; KIMMEL, C. & WOODS, J.: Chronic low level lead toxicity in the rat.III. An integrated assessment of long term toxicity with special reference to the kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 56, 59-77, 1980.

FOWLER B. & GOERING P.: Mechanisms of gallium arsenide (GaAs) inhibition by δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Pharmacologist*, 28, 229, 1986.

FRYDMAN, R.B. & FRYDMAN, B.: Studies on porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen III cosynthase from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 136, 358-373, 1974.

FRYDMAN, R.; AWRUCH, J. & TOMARO, M.: Concerning the specificity of heme oxygenase: the enzymatic oxidation of synthetic hemins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 87, 928 – 936, 1979.

FUMAGALLI, S.A.; KOTLER, M.L.; ROSSETTI, M.V. & BATLLE, A.: Human red cell Porphobilinogen Deaminase. A simpler method of purification and some unusual properties. *Int. J. Biochem.*, 17, 485-494, 1985.

FUKUDA H.; PAREDES S. & BATLLE A.: Active site histidine in pig liver aminolevulinic acid dehydratase modified by diethyl pyrocarbonate and protected by Zn⁺⁺ ions. *Comparat. Biochem. Physiol.*, 91, 285-291, 1988.

GIBSON, K.D.; LOVER, W.G. & NEUBERGER, A.: Initial stages in the biosynthesis of porphyrins 2. The formation of δ -aminolevulinic acid from glycine and succinyl coenzyme A by particles from chicken erythrocytes. *Biochem. J.*, 70, 71-78, 1958.

GOEIJ, A.F.M.; CHRISTIANSE, K. & VAN STEVENINCK, J.: Decreased Haem synthetase activity in blood cells of patients with Erythropoietic Protoporphyrinemia. *Eur. J. Clin. Invest.*, 5, 397-400, 1975.

GRANDCHAMP, G.; DE VERNEUIL, H.; BEAUMONT, C.; CHRETIEN, S.; WALTER, O. & NORDMANN, Y.: Tissue specific expression of porphobilinogen deaminase: two isoenzymes from a single gene, *Eur. J. Biochem.*, 162, 105-110, 1987.

GRANICK, S.: Enzymatic conversion of delta-aminolevulinic acid to porphobilinogen, *Science*, 120, 1105-1107, 1954.

GRANICK, S. & SASSA, S.: δ -aminolevulinic acid synthase and the control of heme and chlorophyll synthesis, en Vogel. H. J. (ed.), *Metabolic Regulation*, vol1, *Metabolic Pathways*, Academic Press, New York, 77-141, 1971.

HANSON, J.W. & DAILEY, H.A.: Purification and characterization of chicken erythrocyte ferrochelatase, *Biochem.J.*, 222, 695-700, 1984.

HAYASHI, N.; YODA, B. & KIKUCHI, G.: Mechanism of allylisopropil acetamide induced increase of δ -aminolevulinic acid synthase in liver mitochondria IV: Accumulation of the enzyme in the soluble fraction of rat liver, *Arch. Biochem. Biophys.*, 131, 83-91, 1969.

HIGUCHI, M. & BOGORAD, L.: The purification and properties of uroporphyrinogen I synthase and uroporphyrinogen III cosynthase. Interactions between the enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 224, 401-408, 1975.

HOARE, D.S. & HEATH, H.: The biosynthesis of porphyrins from Porphobilinogen by *Rhodopseudomonas spheroides* 2- The partial purification and some properties of

Porphobilinogen deaminase and Uroporphyrinogen Decarboxylase, *Biochem.J.*, 73, 679-690, 1959.

JACKSON, A.A.; NAGARAJA RAO, K. & SUPPHAYEN, D. M., Intermediates between uroporphyrinogen I and coproporphyrinogen I., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 696-698, 1977.

JACKSON, A.H. & GAMES, D. E.: The later stages of porphyrin biosynthesis, *Ann. N. Y. Acad. Sci. N. Y.*, 244, 591-596, 1975.

JACOBS, N.J. & JACOBS, J.M.: Protoporphirinogen oxidation in *Rp. Sphaeoides* a step in Heme and Bacteriochlorophyll synthesis, *Arch. Biochem. Biophys.*, 211, 305-311, 1981.

JAFFE, E.K.; SALOWE, S.D; CHEN, N.T. & DE HAVEN, P.A.: Porphobilinogen synthase modification with methyl methaniosulfonate. A protocol for the investigation of metalloproteins, *J.Biol.Chem.*, 259, 5032-5036, 1984.

JAFFE, E.K.: Predicting the Zn (II) ligands in metalloproteins: Case study, Porphobilinogen synthase. *Comments Inorg. Chem.*, 15; 2; 67-92, 1993.

JAFFE, E.K.; ALI, S.; MITCHELL, L.W.; TAYLOR, K.M.; VOLIN, M. & MARKHAM, G.D.: Characterization of the role of the stimulatory magnesium of *Escherichia coli* Porphobilinogen synthase, *Biochemistry*, 34, 244-251, 1995.

JONES, M. & JONES, O.: The structural organization of heme synthesis in rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 507, 113-117, 1969.

JORDAN, P.M. & SHEMIN, D.: Purification and properties of uroporphyrinogen I synthase from *Rhodospseudomonas palustris* *J. Biol. Chem.*, 248, 1019-1024, 1973.

JORDAN, P.M.; BURTON, G.; NORDLOV, H.; SCHNEIDER, M.M.; PRYDER, L.M. & SCOTT, A.: Preuroporphyrinogen: a substrate for uroporphyrinogen III cosynthetase. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 204-205, 1979.

JUKNAT, A.A.; DÖRNEMANN, D. & SENGER, H.: A porphobilinogen deaminase from the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*, *Planta*, 193, 123-130, 1994.

KARDISH, R.M. & WOODS, J.S.: Measurement of heme biosynthetic enzymes in mammalian tissues, *J. Appl. Biochem.* 2, 159-167, 1980

KAYA, A.H.; PLEWINSKA, M.; WONG, D.M.; DESNICK, R.J. & WETMUR, J.G.: Human delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) gene: structure and alternative splicing of the erythroid and housekeeping mRNAs, *Genomics*, 19, 242-248, 1994.

KIKUCHI, G. & HAYASHI, N.: Regulation of heme biosynthesis and intracellular translocation of δ -aminolevulinic acid synthase in the liver, *Mol. Cell. Biochem.*, 37, 227-41, 1982.

KIKUCHI, G.; KUMAR, A.; TALMAGE, P. & SHEMIN, D.: The enzymic synthesis of δ -aminolevulinic acid, *J. Biol. Chem.*, 233, 1214-1219, 1958.

KOOPMANN, G.E; JUKNAT DE GERALNIK, A.A. & BATLLE, A.M. del C., Porphyrins biosynthesis in *Rp. palustris* - V. Purification of porphyrinogen decarboxylase and some unusual properties, *Int. J. Biochem.*, 18, 935-944, 1986.

KOOPMANN, G.E. & BATLLE, A.M. del C.: Biosynthesis of porphyrins in *Rp. palustris* -VI The effect of metals, thiols and other reagents on the activity of uroporphyrinogen decarboxylase, *Int. J. Biochem.*, 4, 373-377, 1987.

KOTLER, M.L.; FUMAGALLI, S.A.; JUKNAT, A.A. & BATLLE, A.: Porphyrin biosynthesis in *Rhodopseudomonas palustris* XIII. Enzymic cyclotetramerization of PBG into uroporphyrinogens- Porphobilinogenase , *Int. J. Biochem.*, 19, 981-985, 1987.

LABBE-BOIS, R. & VALLAND, C.: Changes in the activities of the protoheme synthesizing system during the growth of yeast under different conditions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 179, 565-577, 1977.

LANDER, M.; PITT, A.R.; ALEFOUNDER, P.R.; BARDY, D.; ABELL, C. & BATTERSBY, A.R.: Studies on the mechanism of hydroxymethylbilane synthase concerning the role of arginine residues in substrate binding., *Biochem J* ,275, 447-452, 1991.

LLAMBIAS, E.B.C. & BATLLE, A. M. del C.: Negative homotropic kinetics of soybean callus porphobilinogen deaminase. Uroporphyrinogen III cosynthetase, F.E.B.S. Letters, 9, 180-182, 1970.

LLAMBIAS, E.B.C. & BATLLE, A.M. del C.: Studies on Porphobilinogen deaminase-Uroporphyrinogen III cosynthetase system of cultured soybean cells, Biochem. J., 121, 327-340, 1971.

LLAMBIAS, E.B.C.; LOCASCIO, G. & BATLLE, A.: Porphyrin biosynthesis IX. Porphobilinogen deaminase. Uroporphyrinogen III cosynthetase from avian erythrocytes. Anal. Asoc. Quim. Arg., 59, 271-278, 1971.

LLAMBIAS, E.B.C. & BATLLE, A.M.: Porphyrin biosynthesis VIII Avian erythrocyte PBG deaminase-Urogen III cosynthetase, its purification, properties and separation of its components. Biochim. Biophys. Acta, 227, 180-191, 1971b.

LOMBARDO E.; ARAUJO L.; JUKNAT A & BATLLE A.: Effect of illumination on growth, chlorophyll content and δ -ALA synthesis in *Euglena gracilis*. Comp. Biochem. Physiol., 91B, 279-284, 1988.

MAINES M. & KAPPAS A.: Regulation of heme biosynthetic pathway enzymes and cellular glutathione content by metals that do not chelate with tetrapyrrois: blockade of metal effects by thiols. Proc Natl Acad Sci USA, 74, 1875-1878, 1977.

MATTERS, G.L. & BEALE, S.I.: Structure and expression of the *Chlamydomonas reinhardtii* *alad* gene encoding the chlorophyll biosynthetic enzyme, delta-aminolevulinic acid dehydratase (porphobilinogen synthase), *Plant Mol. Biol.* 27 607-617, 1995.

MAUZERALL, D. & GRANICK, S.: Porphyrin biosynthesis in erythrocytes III. Uroporphyrinogen and its decarboxylase, *J. Biol. Chem.*, 232, 1141-1162, 1958.

MC KAY, R.; DRUYAN, R.; GETZ, G.S. & RABINOWITZ, M.: Intramitochondrial localization of δ -aminolevulinic acid synthase and ferrochelatase in the rat liver, *Biochem. J.*, 114, 455-461, 1969.

MEISLER, M.H.; WANNER, L.; EDDI, R.E. & SHOWS, T.B.: The UPS locus encoding uroporphyrinogen I synthase is located on human chromosome 11, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 95 (1), 170-177, 1980.

MEISLER, M.H.; WANNER, L.; KAO, F.T. & JONES, C.: Localization of the uroporphyrinogen I synthase locus to human chromosome region 11q13→q.ter, *Cytogenet. Cell Gen.*, 31, 124-128, 1981.

MOORE, M.; MEREDITH, P.A. & GOLBERG, A.: Lead and haem biosynthesis en Lead toxicity, Singhal, R. L. and Thomas, J.A. (eds), Baltimore, Urban and Schwarzenberg, 1979.

MOORE, M.R.; MCCOLL, K.E.L. & GOLDBERG, A.: The activities of the enzymes of haem biosynthesis in the porphyrias and during treatment of acute intermittent porphyria., *Int. J. Biochem*, 12, 941-946, 1980.

MORAN-JIMENEZ, M.J.; GED, C.; ROMANA, M.; ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R.; TAICH, A.; TOPI, G.; D'ÀLESSANDRO, L. & DE VERNEUIL, H.: Uroporphyrinogen decarboxylase: complete human gene sequence and molecular study of three families with hepatoerythropoietic porphyria, *Am. J. Hum. Genet.*, 58, 712-721, 1996

MULLER, W.; LISSNER, R. & IPPEN, H.: δ -aminolevulinic acid dehydratase (EC 4.3.1.24), A Review, in *Pyrrole Information*, 2, 18-50, 1974.

NAKASHI, Y.; TAKETANI, S.; OKUDA, M.; INONE, K. & TOKUNAGA, R. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human ferrochelatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 173, 748-755, 1990.

NAMBA, H.; NARAHARA, K.; TSUJI, K.; YOKOYAMA, Y. & SEINO, Y.: Assignment of human porphobilinogen deaminase to 11q24.1→q.24.2 by *in situ* hybridization and genes dosage studies, *Cytogenet. Cell Genet.*, 57, 105-108, 1991.

NAVONE N.; AFONSO S.; POLO C. & BATLLE A.: Uroporphyrinogen decarboxylase from mouse mammary carcinoma and liver of normal and tumor-bearing mice. *Compar. Biochem. Physiol. B*, 102, 87-92, 1992.

NEUBERGER, A. & SCOTT, J.J.: Aminolaevulinic acid and porphyrin biosynthesis. *Nature*, 172, 1093-1098, 1953.

NISHIMURA, K.; TAKETANI, S. & INOKUCHI, H.: Cloning of human cDNA protoporphyrinogen oxidase by complementation *in vivo* of a hemG mutant of *E. coli*, *J. Biol. Chem.*, 270 (14), 8076-8080, 1995.

OHASHI, A. & KIKUCHI, G.: Purification and some properties of two forms of δ -aminolevulinic acid synthetase from rat liver cytosol, *J. Biochem. (Tokio)*, 83, 239-247, 1979.

PATERNITTI, J.R. & BEATTIE, D.S.: δ -aminolevulinic acid synthetase from rat liver mitochondria. Purification and properties, *J. Biol. Chem.* 253, 6112-6118, 1979.

PAVETO, C.; PASSERON, S.; STELLA, A.M. & BATLLE, A.: Regulatory role of δ -aminolevulinic acid dehydratase in the dimorphic fungus *mucor rouxii*, *Comp. Biochem. Physiol.* 94B, 635-639, 1983.

PORRA, R.J. & FALK, J.E.: The enzymic conversion of coproporphyrinogen III into protoporphyrin IX, *Biochem. J.*, 90, 69-75, 1964.

PORRA R. & JONES O.: Studies on ferrochelatase. An investigation of the role of ferrochelatase in the biosynthesis of various prosthetic groups. *Biochem J.*, 87, 186 – 191, 1963.

POULSON, R. & POGLASE, W.J.: Aerobic and anaerobic coproporphyrinogenase activities in extracts from *Saccharomyces cerevisiae*: Purification and characterization, J.Biol. Chem., 249, 6367-6371, 1974.

POULSON, R. & POGLASE, W.J.: The enzyme conversion of protoporphyrinogen IX. Protoporphyrinogen oxidase activity in mitochondrial extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. J.Biol. Chem., 250, 1269-1274, 1975.

POULSON, R.: The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX. to protoporphyrin IX in mammalian mitochondria, J.Biol. Chem., 251, 3730-3733, 1976.

RAICH, N.; ROMÉO, P.H.; DUBART, A. BEAUPAIN, D.; COHEN-SOLAL, M. & GOOSENS, M.: Molecular cloning and complete primary sequence of human erythrocyte porphobilinogen deaminase, Nucleic Acid Res., 14, 5955-5968, 1986.

RIDDLE, R.D.; YAMAMOTO, M. & ENGEL, J.D.: Expression of δ -aminolevulinate synthase in avian cells : separate gens encode erythroid-specific and non specific isozymes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 792-796, 1989.

RIMINGTON, C.: Porphyrin biosynthesis. Rev. Pure and Appl. Chem. (Royal Australian Chemical Institute), 8, 129-160, 1958.

RIOS DE MOLINA, M.C.; TAIRA, M.C. & SAN MARTIN DE VIALE, L.: Liver ferrochelatase from normal and hexachlorobenzene porphyric rats. Studies on their properties. Int J Biochem, 21, 219-225, 1989.

RÍOS DE MOLINA, M.; BILLI DE CATABBI, S. & SAN MARTÍN DE VIALE L.: Liver ferrochelatase from normal and hexachlorobenzene porphyric rats. Mechanism of drug action. *Int J Biochem*, 23, 669-73, 1991.

ROMANA, M.; DUBART, A. BEAUPAIN, D.; CHABRET, C.; GOOSSENS, M. & ROMEO, P.H.: Structure of the gene for human uroporphyrinogen decarboxylase", *Nucl. Ac. Res.*, 15 , 7343-7356, 1987.

ROMÉO, G. & LEVIN, E. Y.: Uroporphyrinogen decarboxylase from mouse spleen. *Biochim. Biophys. Acta.*, 230, 330-341, 1971.

ROMÉO, P.H.; RAICH, N.; DUBART, A.; BEAUPAIN, D.; PRYOR, M.; KUSHNER, J.; COHEN-SOLAL, M. & GOOSSENS, M.: Molecular cloning and nucleotide sequence of a complete human uroporphyrinogen decarboxylase cDNA, *J. Biol. Chem.*, 261, 9825-9831, 1986.

ROSSETTI, M.V.; JUKNAT, A.A.; KOTLER, M.L.; FUMAGALLI, S. & BATLLE, A.: Occurrence of multiple molecular forms of porphobilinogenase in diverse organisms: The minimum quaternary structure of porphobilinogenase is a protomer of one Deaminase and one Isomerase domain, *Int. J. Biochem.*, 12, 761-767, 1980.

ROSSETTI, M.V.; JUKNAT, A.A.; ARAUJO, L.; LOMBARDO, E. & BATLLE, A.M.del C.: Porphyrin biosynthesis in *Euglena gracilis* –V: soluble and particulate PBGase, *Comparat. Biochem. Physiol.*, 85, 451-458, 1986.

SAKAI, T.; YANAGIHARA, S. & USHIO, K.: Effect of preincubation on ALA-D inhibition by added lead. J. Japan Acc. Med. Assoc., 28, 56-61, 1980.

SALZMAN, T. & BATLLE, A.M. del C: Heme synthetase in *Trypanosoma cruzi*, Comparat. Biochem. Physiol., 85, 537-541, 1986.

SANCOVICH, H.; BATLLE, A.M.del C. & GRINSTEIN, M.: Porphyrin biosynthesis VI. Separation and purification of PBG deaminase and Urogen III cosynthetase from cow liver. PBGase an allosteric enzyme., Biochim. Biophys. Acta, 191, 130-143, 1969a.

SANCOVICH, H.; BATLLE, A. & GRINSTEIN, M.: The porphobilinogen deaminase uroporphyrinogen III cosynthetase system (porphobilinogenase) from bovine liver, kinetic studies. FEBS Lett., 3, 223-226, 1969b.

SAN MARTIN DE VIALE, L.C. & GRINSTEIN, M.: "Porphyrin biosynthesis IV.-5 AND 6-COOH porphyrinogens (type III) as normal intermediates in haem biosynthesis", Biochim. Biophys. Acta, 158, 79-91, 1968.

SANO, S. & GRANICK, S.: Mitochondrial coproporphyrinogenase and protoporphyrin formation, J. Biol. Chem., 1173-1180, 1961.

SANO, S.: 2-4 bis (δ -hidroxipropionic acid) deuteroporphyrinogen IX, a possible intermediate between coproporphyrinogen III and protoporphyrin IX. J. Biol. Chem., 241, 5276-5288, 1966.

SASSA, S. & KAPPAS, J.: Disorders of heme production and catabolism, en Blood: Principles and Practice hematology; R. Handin; S.E. Lux & T. Stossel ed., J.B. Lippincott Company, Philadelphia, pp 1473-1523, 1995.

SASSA, S. & GRANICK, S.: Induction of δ -aminolevulinic acid synthetase in chick embryo cells in culture , Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 67, 517-522, 1970.

SCOTT, A.I.; BURTON, G.; JORDAN, P.M.; MATSUMOTO, H.; FAGERNESS, P.E. & PRYDE, L.: Spectroscopy as a probe for the study of enzyme-catalysed reactions. Further observations of preuroporphyrinogen, a substrate for uroporphyrinogen III cosynthetase. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 384-387, 1980.

SHEMIN, D. & RITTENBERG, D.: The mechanism of porphyrin formation. The role of tricarboxylic acid cycle. J. Biol. Chem., 192, 315-322, 1951.

SHEMIN, D. & RUSSEL, C.S.: δ -aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. J. Am. Chem. Soc., 75, 4873-4874, 1953.

SMITH, A. & FRANCIS, J.E.: Investigations of rat liver uroporphyrinogen decarboxylase. Comparisons of porphyrinogens I and III as substrates and the inhibition by porphyrins. Biochem. J. 195, 241-250, 1981.

SMITH, S.G.; FERRAMOLA, A.M.; SANCOVICH, H.A.; EVANS, N.; MATTIN, S.A.; RYDER, D.J. & JACKSON, A. H.: Pentacarboxylic intermediates in haem biosynthesis, *Ann. Clin. Res.* 8, Suppl. 17, 89-91., 1976.

SPANO, A. & TIMKO, M.: Isolation, characterization and partial aminoacid sequence of a chloroplast-localized porphobilinogen deaminase from pea (*Pisum Sativum L.*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1076, 29-36, 1991.

SPENCER, P. & JORDAN, P. M.: Investigation of the nature of the two metal-binding sites in 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. *Biochem-J.* 300, 373-381, 1994.

SPENCER, P. & JORDAN, P.M.: Characterization of the two 5-aminolaevulinic acid binding sites, the A- and P-sites, of 5-aminolaevulinic acid dehydratase from *Escherichia coli*. *Biochem-J.* , 305, 151-158, 1995.

STAFFORINI D.; POLO C.; STELLA A. M.; WIDER DE XIFRA E. & BATLLE A.: Pig liver aminolevulinic acid dehydratase. II. Studies on different conditions influencing its molecular weight determination. *Int. J. Biochem.*, 12, 757-760, 1980.

TAKETANI, S. & TOKUNAGA, R.: Purification and substrate specificity of bovine liver. Ferrochelatase, *Eur. J. Biochem.*, 127, 443-447, 1982.

TAKETANI, S.; INAZAWA, J.; NAKAHASHI, Y.; ABE, T. & TOKUNAGA, R.: Structure of the ferrochelatase gene. *Eur. J. Biochem.* 205, 217-222, 1992.

TAKETANI, S.; KOHO, H.; FURUKAWA, T.; YOSHINAGA, T. & TOKUNAGA, R.
Molecular cloning, sequencing and expression of cDNA encoding human
coproporphyrinogen oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1183, 547-549, 1994

TAKETANI, S.; IMAZAWA, J.; ABE, T.; FUNIKAWA, T.; KOHO, H.; TOKUNAGA, R.;
NISHIMURA, K. & INOKUCHI, H.: The human protoporphyrinogen oxidase gene
(Ppox): Organization and location to chromosome 1, *Genomics*, 29, 698-703, 1995.

THOMAS, S.D. & JORDAN, P.M.: Nucleotid sequence of the hemC locus encoding
porphobilinogen deaminase of *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res.*, 14, 6215-
6225, 1986.

TIGIER, H.A.; BATLLE, A.M. del C. & LOCASCIO, G.A.: Porphyrin biosynthesis in
soybean callus tissue system.III. Improved purification and some properties of
 δ -aminolaevulinate dehydratase, *Enzymology*, 38, 43-56, 1970.

TOMIO, J.M.; GARCIA, R.C.; SAN MARTIN DE VIALE, L.C. & GRINSTEIN, M.:
Porphyrin biosynthesis VII. Porphyrin carboxy-lyase from avian erythrocytes,
Purification and properties, *Biochim. Biophys. Acta*, 198, 353-363, 1970.

TSAI, S.F.; BISHOP, D.F. and DESNICK, R.J.: Couple-enzyme and direct assays for
uroporphyrinogen III synthase activity in human erythrocytes and cultured lymphoblasts,
Anal. Biochem., 166, 120-133, 1987.

TSAI, S.F.; BISHOP, D.F. & DESNICK, R.J.: Human uroporphyrinogen III synthase: molecular cloning, nucleotide sequence and expression of a full length cDNA, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7049-7053, 1988.

TSUKAMOTO, I.; YOSHINAGA, T. & SANO, S.: The role of zinc with special reference to the essential thiol groups in δ -aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver, Biochim. Biophys. Acta, 570, 167-178, 1979.

VARTICOWSKI, L.; KUSHNER, J.; & BURNHAM, B.: Biosynthesis of porphyrin precursors: Purification and characterization of mammalian L-alanine, γ - δ , dioxovaleric acid aminotransferase. J. Biol. Chem., 255, 3742-3747, 1980.

WADA, O.; SASSA, S.; TAKAKU, F.; YANO, Y.; URATA, G. & NAKAO, K.: Different responses of the hepatic and erythropoietic δ -aminolevulinic acid synthase of mice. Biochim. Biophys. Acta, 148, 585-587, 1967.

WANG, A.L.; ARREDONDO-VEGA, F.X.; GIAMPIETRO, P.F.; SMITH, M.; ANDERSON, W.F. & DESNICK, R.J.: Regional gene assignment of human porphobilinogen deaminase and esterase $\Delta 4$ to chromosome 11q23 \rightarrow 11q.ter, Proc. Natl. Acad. USA, 78, 5734-5738, 1981.

WANG, A.L.; ASTRIN, K.H.; ANDERSON, W.F. & DESNICK, R.J.: Delta-aminolevulinic acid dehydratase: induced expression and regional assignment of the human gene to chromosome 9q13---qter. Hum. Genet., 70, 6-10, 1985.

WARREN, M.J. & SCOTT, A.: Tetrapyrrole assembly and modification into ligands of biologically functional cofactors. *Trends Biochem. Sci*, 15, 486-491, 1990.

WHITING, M. & ELLIOT, W. H.: Purification and properties of solubilized mitochondrial δ -aminolevulinic acid synthetase and comparison with the cytosol enzyme. *J. Biol. Chem.*, 247, 6818-6826, 1972.

WHITING, M.J. & GRANICK, S.: δ -aminolevulinic acid synthase by isolated liver polysomes. *Biochem. J.*, 158, 391-400, 1976.

WILLIAMS, D.C.; MORGAN, E.S. & BATTERSBY, A.R.: Purification of porphobilinogen deaminase from *Euglena gracilis* and studies of its kinetics. *Biochem. J.*, 301-310, 1981.

WOOD, J.S.: Studies on the role of heme in the regulation of δ -aminolevulinic acid synthase during fetal hepatic development. *Mol. Pharm.*; 10, 389-397, 1974.

WOODS, J.S. & FOWLER, B.: Selective inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase by indium chloride in rat kidney: biochemical ultrastructural studies. *Exp Molec Pathol.*, 36, 306-315 1982.

WOODS J.S. & FOWLER, B.: Alterations in mitochondrial structure and heme biosynthetic parameters in liver and kidney cells by bismuth: relationship to cell injury. *Toxicol Appl Pharmacol*, 90, 274-283, 1987.

WU, W.; SHEMIN, D.; RICHARDS, K. y WILLIAMS, R.: The quaternary structure of 5-Aminolevulinic acid dehydratase from bovine liver. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 71; 1767-1772, 1974.

XU, W.; KOZACK, A.C. & DESNICK, R.J.: Uroporphyrinogen III synthase: Molecular cloning, nucleotide sequence, expression of a mouse full-length cDNA and its regional assignment to mouse chromosome 7, Genomics, 26, 556-562, 1995.

YAMAMOTO M., HAYASHI, N. & KIKUCHI, G.: Translational inhibition by heme of the synthesis of hepatic δ -aminolevulinate synthase in a cell free system. Biochem. Biophys. Res. Commun., 115; 225-231, 1983.

YAMAMOTO, M.; YEW, N.S.; FEDERSFIEL, M., DOGSON, J.B.; HAYASHI, N. & ENGEL, J.D.: Isolation and recombinant cDNAs encoding chicken erythroid-aminolevulinate synthase, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 3702-3706, 1985.

YOSHINAGA, T. & SANO, S.: Coproporphyrinogen oxidase I. Purification properties, and activation by phospholipids, J. Biol. Chem., 255, 4722-4726, 1980.

ZAMAN, Z.; ABBOUD, M.M. & AKHTAR, M.: Mechanism and stereochemistry of vinyl group formation in heme biosynthesis, J. Chem. Soc. Chem. Comm., 1263-1264, 1972.

ZAMAN Z.; JORDAN P. & AKHTAR M.: Mechanism and stereochemistry of the 5-aminolevulinate synthetase reaction. Biochem. J., 135, 257-263, 1973.

CAPITULO III

PORFIRIAS

	Página
III.1. Introducción.....	79
III.2. Defectos enzimáticos en las porfirias.....	81
III.3. Porfiria aguda intermitente.....	82
III.4. Porfiria por deficiencia del ALA-D.....	84
III.5. Porfiria variegata.....	86
III.6. Coproporfiria hereditaria y harderoporfiria.....	88
III.7. Porfiria cutánea tarda y Porfiria hepatoeritropoyética.....	88
III.8. Protoporfiria eritropoyética.....	92
III.9. Porfiria congénita eritropoyética.....	93
III.10. Bibliografía.....	96

III. PORFIRIAS:

III.1. INTRODUCCION:

Son un grupo de enfermedades hereditarias, del camino biosintético del hemo, en las cuales una falla genética en una de las enzimas que catalizan las diferentes etapas de este camino conduce a una deficiencia parcial de la misma que a su vez desencadena un cuadro bioquímico específico para cada porfiria.

Si bien estas patologías son genéticamente heterogéneas, el fenotipo clínico es relativamente uniforme en cada una de ellas. Consecuentemente, cada porfiria tiene manifestaciones clínicas características que se pueden diagnosticar con ensayos de laboratorio específicos (Bissel, 1982).

Los intermediarios (porfirinógenos, porfirinas, y sus precursores ALA y PBG) se producen en exceso y acumulan en los tejidos, lo que lleva a síntomas neurológicos o cutáneos, o a ambos. Por otro lado, si bien todas las porfirias (excepto dos) se heredan en forma autosómica dominante la penetrancia es muy variable; y en general, los portadores del gen afectado pueden permanecer asintomáticos durante toda su vida.

Además, teniendo en cuenta que en estos casos los estudios bioquímicos no son siempre absolutamente seguros para su diagnóstico, la detección e identificación de la mutación en el gen que codifica la enzima afectada, responsable de la porfiria, constituye en muchos casos, la única forma de identificar los portadores asintomáticos.

El primer caso de porfiria documentado fue el de una mujer en quien la porfiria fue inducida por sulfonal descrito por Stokvis en 1889. La clasificación de las porfirias, ha sufrido modificaciones desde la primera realizada por Günther en 1911 hasta nuestros días (Tabla III.1.) a medida que fue evolucionando el conocimiento y el estudio de las mismas (Batlle, 1993).

Estos desórdenes se clasifican en hepáticos o eritropoyéticos dependiendo del tejido donde la disfunción metabólica está presente y se expresa con mayor intensidad. Adicionalmente, las porfirias hepáticas pueden clasificarse en agudas o crónicas (Moore *et al.*, 1987).

Las porfirias agudas se caracterizan por un ataque agudo, generalmente neurológico, relacionado con la falla enzimática, incluyen a la ALA-D porfiria (ALAD-P), porfiria aguda intermitente (PAI), coproporfiria hereditaria (CPH) y porfiria variegata (PV).

En contraste, las porfirias hepáticas crónicas se caracterizan por una superproducción de porfirinas y síntomas cutáneos, sin ataque agudo; e

incluyen a la porfiria cutánea tarda (PCT) y la porfiria hepatoeritropoyética (PHE).

III. 2. DEFECTOS ENZIMATICOS EN LAS PORFIRIAS:

En las porfirias disminución de la velocidad de formación del hemo se compensa por la inducción de la enzima ALA-S, además de un incremento en la concentración del sustrato de la enzima defectuosa.

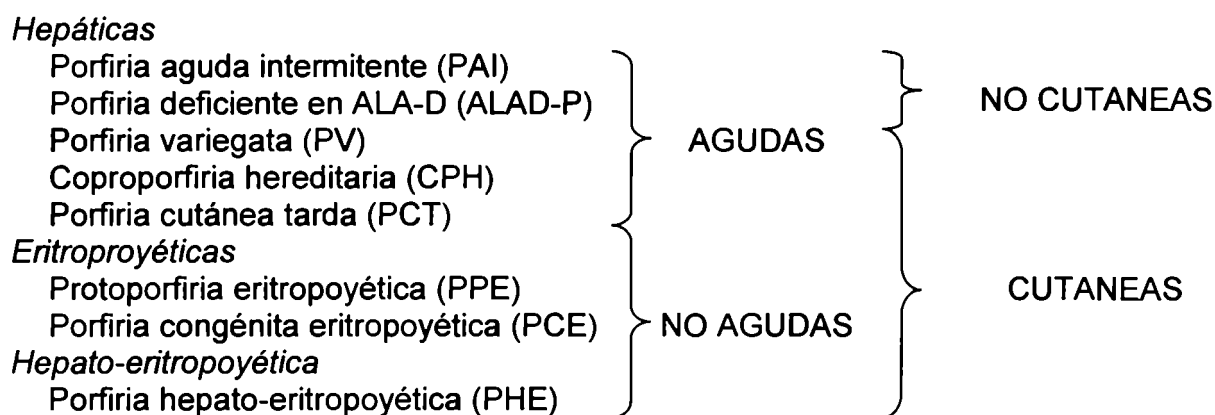


FIGURA III .1: Clasificación de las porfirias

La acumulación intracelular y la subsecuente excreción del sustrato produce un patrón de precursores y porfirinas característico, en hígado, plasma, eritrocitos, orina y heces, según sea la deficiencia enzimática específica (Kushner et al., 1976; Elder et al,1977; Felsher et al., 1982; Kappas et al.,1989).

Los individuos que heredan el gen de alguna de las porfirias autosómicas dominantes tienen cuantitativamente deficiencias enzimáticas similares, sin embargo probablemente no más del 10 % desarrollen síntomas.

Cada tipo de porfiria tiene un patrón característico de los precursores (ALA y PBG) y/o porfirinas en sangre y excreta (Batlle *et al.*, 1993). Esta distribución particular está determinada por el sitio del bloqueo enzimático.

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

III. 3. PORFIRIA AGUDA INTERMITENTE:

Es la más común de las porfirias agudas y se transmite con carácter autosómico dominante, con penetrancia incompleta. Es el resultado de una deficiencia parcial en la Porfobilinógeno deaminasa (PBG-D). Su prevalencia se estima en aproximadamente 1/20.000 en los países europeos, con la excepción de ciertas áreas de Suecia en las cuales es de alrededor de 1/1.500 (Bonkowsky, 1982).

El despertar clínico de la enfermedad generalmente ocurre durante o después de la pubertad y se caracteriza por estados de remisión y exacerbación de la sintomatología, de allí su nombre. Clínicamente se

encuentra un amplio espectro de manifestaciones neurológicas y psiquiátricas, sin producción de lesiones dermatológicas; mientras que bioquímicamente se observa excreción de los precursores ALA y PBG en orina.

Como se ha señalado el defecto enzimático se encuentra a nivel de la PBG-D, cuya actividad se encuentra disminuida en un 50% en eritrocitos (Strand *et al.*, 1970; Batlle & Rossetti, 1977) .Los desencadenantes más comunes son barbitúricos, estrógenos, alcohol y sulfamidas.

Como toda porfiria aguda se caracteriza por dolores abdominales. El enfermo presenta estado de agitación, vómitos, estreñimiento, y distintas manifestaciones neuropsiquiátricas como excitación, ansiedad, estado confusional, insomnio y frialdad.

A pesar de que el hígado es el órgano donde los precursores, ALA y PBG, se sintetizan en exceso, los síntomas clínicos pertenecen casi exclusivamente al sistema nervioso. La etiología de esta enfermedad aún se desconoce, las hipótesis planteadas se refieren al compromiso del ALA como neurotóxico (Percy *et al.*, 1981; Bermudez Moretti *et al.*, 1995)

Los estudios en sistema nervioso demostraron que el ALA ejerce una acción interferente sobre la liberación de neurotransmisores, como así también se ha descrito la acción inhibitoria de este precursor sobre la ATPasa Na-K dependiente, en cerebro humano y de conejo (Brennan & Cantril, 1981).

La similitud estructural entre el ALA y el GABA, llevó a sugerir que la acción de neurotransmisor inhibitorio de este último, fuera la misma o antagonizada por el ALA. El ALA competiría con el GABA por la unión a su receptor, hecho observado en sinaptosomas de rata (Taljaard et al,1981). No obstante, para producir dichos efectos tóxicos, el ALA debería atravesar la barrera hematoencefálica, lo cual aún no está aclarado. Otra posibilidad es que el sistema nervioso acumule elevadas cantidades de ALA, producto de la propia biosíntesis de hemo, cuya ruta estaría alterada al igual que en otros tejidos.

Recientemente se ha intentado explicar las bases bioquímicas del desorden relacionando la acumulación de ALA con el stress oxidativo. Esto se basa en que el ALA se autooxida espontáneamente, liberándose especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH\cdot$) y anión superóxido (O_2^-) (Hermes-Lima et al., 1991), (Figura III.2).

III. 4. PORFIRIA POR DEFICIENCIA DE ALA DEHIDRASA:

Es un desorden autosómico recesivo que resulta de una deficiencia casi total de la actividad de la enzima ALA-D.

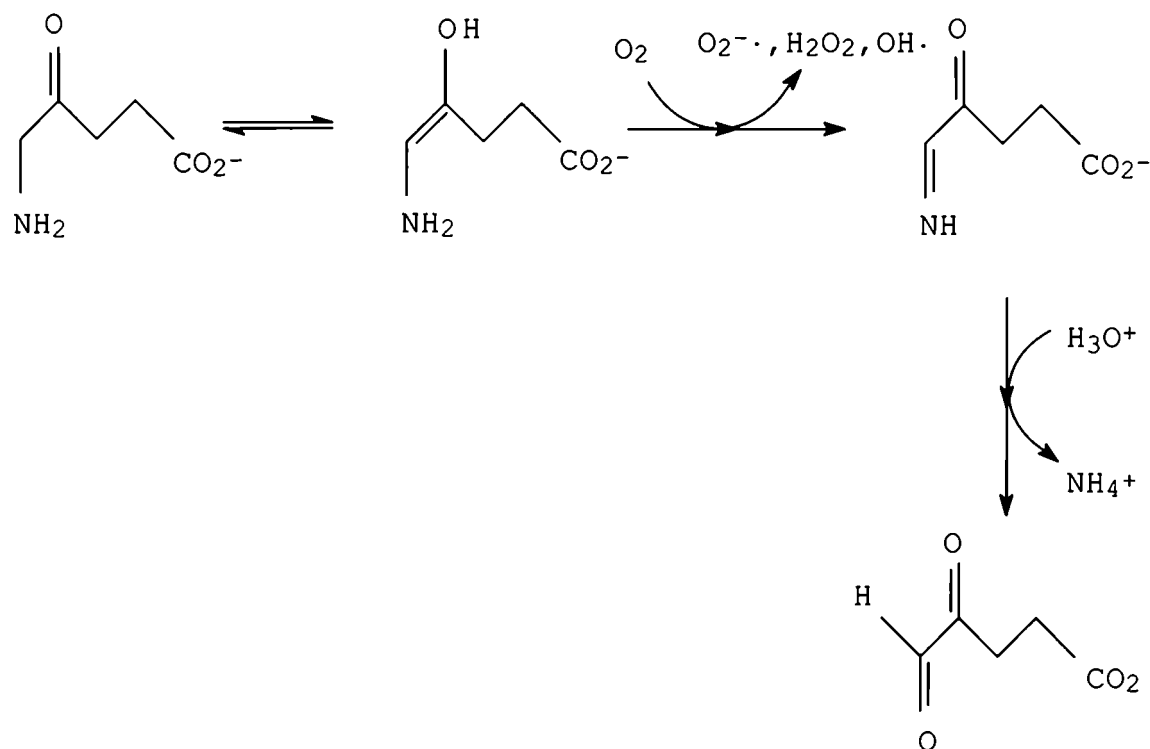


FIGURA III. 2. :Esquema de la autooxidación del ALA

Otras condiciones como la intoxicación por plomo y la tirosinemia hereditaria, pueden presentar síntomas similares debido a la marcada inhibición de la actividad de la enzima ALA-D.

Esta porfiria es la más rara de las porfirias y son muy pocos los casos descriptos (Doss et al., 1979; Thunell et al., 1987; Hassoun et al., 1989).

En uno de estos casos se ha encontrado una mutación en el gen del ALA-D, consistente en una sustitución de una A por una G en el nucleótido 820 (mutación G2) que resulta en un cambio de la alanina 274 por un triptofano. La mutación G1 encontrada en otro paciente, fue una transición de una base T

(nucleótido 718) que produce un cambio de una arginina 240 por un triptofano (Ishida et al., 1990 ; 1992).

En 1991, Plewinska et al. describieron un caso de ALAD-P infantil, en el cual la madre presentaba una transición de un nucleótido G por A (nucleótido 397), que resultaba en el cambio de una glicina (133) por una arginina en el sitio de unión del cinc de la enzima. La mutación paterna en cambio, era una transición del nucleótido 823 (G por A) resultante en un cambio de la valina 275 por una metionina.

La sintomatología es similar a la de la porfiria aguda intermitente, caracterizada por vómitos, dolores en las piernas, y neuropatía. En etapas siguientes de la enfermedad se desarrolla parálisis en las piernas, brazos e insuficiencia respiratoria (Doss et al., 1979; Thunell et al., 1987). La excreción de ALA urinario es marcadamente elevada. La coproporfirina III y la protoporfirina IX están muy elevadas en orina y glóbulos rojos.

III. 5. PORFIRIA VARIEGATA:

La Porfiria Variegata (PV) es una porfiria hepática aguda que se transmite con un carácter autosómico dominante con penetrancia incompleta y aparece como consecuencia de una deficiencia parcial en la penúltima enzima del camino biosintético del hemo, la Protoporfirinógeno oxidasa (PPGox) (Brenner & Bloomer, 1980).

Las manifestaciones de la PV generalmente ocurren después de la pubertad con una expresión variada de su sintomatología: dolores abdominales, fragilidad cutánea que produce lesiones, fotosensibilidad y trastornos neurológicos. O sea, combina los síntomas de las porfirias cutáneas y agudas, es por ello que también se la llama porfiria mixta. Se encuentra un aumento de los precursores ALA y PBG que se excretan por orina y son los responsables de los síntomas neurológicos. También se observa un aumento de porfirinas, protoporfirina que se excreta por heces y en menor proporción coproporfirina; responsables de la sintomatología cutánea. Se debe aclarar que no siempre se observan ambas sintomatologías en todos los pacientes.

Los ataques agudos se pueden precipitar por una gran variedad de drogas, pero en su mayoría por barbituratos, sulfonamidas y algunos anestésicos.

La PV se conoce también como porfiria sudafricana, dado que es la porfiria más común en ese país. Su incidencia entre la población africana es de 3 casos cada 1.000 habitantes y esta elevada incidencia se debe a su introducción en la zona por una de las primeras familias que se instalaron en ella, provenientes de Holanda, hace más de 300 años (Dean, 1972 ; Diamond & Rotter, 1987).

La actividad de PPGox en pacientes con PV y en portadores asintomáticos está disminuída alrededor de un 50%, en relación con los valores normales, en todos los tejidos (Brenner & Bloomer, 1980).

III . 6. COPROPORFIRIA HEREDITARIA Y HARDEROPORFIRIA:

La Coproporfiria Hereditaria (CPH) es una porfiria hepática aguda que se hereda con carácter autosómico dominante pero con un grado variable de expresión clínica. Surge como consecuencia de una deficiencia enzimática parcial de la enzima Coproporfirinógeno oxidasa (CPGasa). Bioquímicamente se caracteriza por la excreción de cantidades elevadas de COPRO III, en orina y heces.

Una deficiencia más severa en esta enzima da lugar a otra porfiria: la Harderoporfiria considerada como una variante homocigota de la CPH. Bioquímicamente se caracteriza por una excreción masiva de Harderoporfirina y una disminución muy marcada de la CPGasa. A diferencia de la CPH, se transmite con carácter autosómico recesivo.

III.7. PORFIRIA CUTANEA TARDA Y PORFIRIA HEPATOERITROPOYETICA:

Una deficiencia en la actividad de la enzima Uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D) hepática, que cataliza la formación de coproporfirinógeno III a partir de uroporfirinógeno III, es la responsable de 3

patologías: Porfiria Cutánea Tarda esporádica (PCT-s), Porfiria Cutánea Tarda familiar (PCT-f) y Porfiria Hepatoeritropoyética (PHE) (De Verneuil et al., 1984; Kappas et al., 1989).

En la PCT-s la actividad disminuída de URO-D está restringida al hígado, encontrándose valores normales en eritrocitos.

En la PCT-f , en cambio, la actividad enzimática está reducida en aproximadamente un 50% con respecto a los valores normales en todos los tejidos.

La PHE es una forma severa de PCT que generalmente aparece en la infancia con un cuadro clínico similar al de la Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE), con un compromiso de fotosensibilidad cutánea muy importante, pero con un patrón de excreción urinario característico de PCT.

En la PHE la actividad de URO-D en eritrocitos puede estar reducida a tan solo un 10% con respecto a los valores normales (Kappas et al, 1989), de tal forma que se la considera como una forma homocigota de la PCT.

En la PCT-f y PHE la actividad reducida de URO-D está asociada a mutaciones en el gen que codifica la enzima; no encontrándose mutaciones en los casos de PCT-s, por lo que se la considera una porfiria adquirida, y

aparentemente, sería el resultado de la formación de un inhibidor de la actividad de URO-D solamente en hígado (Garey et al., 1989).

Finalmente, desde el punto de vista de las proteínas mutadas en base a estudios inmunológicos con anticuerpos anti URO-D y a los valores de actividad enzimática, los pacientes con PCT-f y PHE se pueden dividir en 3 grupos: CRIM-negativos, CRIM-positivos y CRIM-superneгатivos; estos últimos se caracterizan por ausencia de proteína detectable asociada a una actividad enzimática significativa (De Verneuil et al., 1984; Fujita et al., 1987; Toback et al., 1987; Koszo et al., 1990).

La PHE es una enfermedad poco frecuente; se han descrito hasta la fecha, alrededor de 30 pacientes. Desde el punto de vista clínico, es difícil de distinguirla de la PCE (Cruces-Prado, 1980; De Verneuil, 1992). Sin embargo, cuando el fenotipo es leve la enfermedad se puede confundir con un caso de PCT-f.

Analizando la frecuencia de las mutaciones en URO-D observadas en 14 familias españolas (Moran-Jimenez et al., 1996) se observa una estricta homogeneidad genética. Excepto un caso, todos los pacientes españoles portan la mutación G281E en estado homocigota.

Sin embargo, en familias de otros países, se observa heterogeneidad en las mutaciones de la URO-D y cada una porta 1 ó 2 mutaciones específicas (De Verneuil et al., 1993; Roberts et al., 1995).

Por otro lado, cabe aclarar que en la mayoría de las familias estudiadas, la consanguineidad entre los padres del paciente explicaría el elevado porcentaje de homocigosis para las mutaciones en la URO-D.

Hasta hace poco la PHE y la PCT-f se consideraban dos tipos diferentes de porfiria puesto que los padres de pacientes con PHE no habían desarrollado el fenotipo clínico de una PCT-f. Además las mutaciones observadas en pacientes PHE no se habían observado en familias con PCT-f (De Verneuil et al., 1993).

Sin embargo, recientemente la mutación G281E se ha descrito en estado heterocigota en miembros de familias con PHE, los cuales luego desarrollaron PCT-f (Roberts et al., 1995; Moran-Jimenez et al., 1996).

Además, las mutaciones V134Q y H220P (Garey et al., 1993); P62L y Y311C (Moran-Jimenez et al., 1996) producen un fenotipo relativamente leve, con un efecto similar sobre la actividad de la URO-D y acompañadas de una expresión clínica de fotosensibilidad en la piel sólo en homocigotas o en heterocigotas dobles.

Finalmente, la identificación de los defectos moleculares en el gen de la URO-D contribuye significativamente al análisis de casos no-clasificados de porfiria. Además, en casos severos de PHE, en los cuales podría aplicarse la terapia génica en el futuro, el conocimiento preciso de las lesiones moleculares es un prerrequisito para cualquier protocolo de transferencia de genes. La disponibilidad de un modelo experimental de la enfermedad permitirá realizar experimentos de terapia génica, *in vivo* o *ex vivo*.

III.8. PROTOPORFIRIA ERITROPOYETICA:

La Protoporfiria Eritropoyética (PPE), la más común de las porfirias eritropoyéticas, se hereda en forma autosómica dominante con penetrancia incompleta. Clínicamente se caracteriza por fotosensibilidad y disfunción hepatobiliar y bioquímicamente por una acumulación en eritrocitos, plasma e hígado de PROTO IX que se excreta por materia fecal. Su expresión clínica es muy variable. La actividad de ferroquetasa, enzima que cataliza el último paso de la biosíntesis del hemo, está disminuida aproximadamente un 50% con respecto a los valores normales en todos los tejidos. Esta disminución es consistente con la acumulación de PROTO IX, sustrato de la enzima, y explica la fotosensibilidad cutánea (Nakahashi et al., 1992).

En 1991 Stroka et al., estudiaron dos pacientes con PPE en los cuales la actividad de la enzima estaba disminuida un 80% con respecto al valor normal, pero no encontraron una disminución paralela en el material inmunorreactivo

(CRIM negativo). Estos resultados demostraban que los pacientes poseían una cantidad normal de proteína y sugerían que la PPE surgiría como consecuencia de mutaciones en el gen de la ferroquelatasa.

III. 9. PORFIRIA CONGENITA ERITROPOYETICA:

La Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE) también conocida como enfermedad de Günther, se produce como consecuencia de una deficiencia muy significativa en la actividad de la cuarta enzima del camino biosintético del hemo la Uroporfirinógeno III cosintetasa o Isomerasa. La Isomerasa cataliza la isomerización y ciclización del tetrapirrol lineal, hidroximetilbilano (HMB), para formar el uroporfirinógeno III (UROGEN III). En pacientes con este desorden autosómico recesivo, el defecto enzimático lleva a una acumulación del HMB el cual rápida y no-enzimáticamente se cicla a UROGEN I. La uroporfirina I (URO I), producto de oxidación del UROGEN I se acumula en eritrocitos produciendo la hemólisis de los mismos, la porfirina liberada se deposita en tejidos y huesos y se excreta por orina y heces.

Además la URO I es un compuesto fotosensible por lo cual la exposición a la luz solar, u otras formas de luz UV, daña el tejido y lleva a la formación de ampollas y vesículas dando lugar a una infección secundaria, cicatrización cutánea, reabsorción del hueso y deformaciones, especialmente en manos y cara.

Las manifestaciones clínicas de la PCE son marcadamente heterogéneas variando desde "hydrops fetalis" no inmune, debido a una severa anemia hemolítica en el útero, hasta formas más leves en adultos (Deybach et al., 1981; Moriguchi et al., 1989; Verstraeten et al., 1993; Desnick & Anderson, 1995; Kappas et al., 1995).

Los pacientes afectados severamente son transfusión-dependiente toda su vida, presentan un hiperesplenismo secundario y están generalmente desfigurados por el importante compromiso cutáneo. Otras manifestaciones incluyen hipertrichosis, alopecia y eritrodoncia. En cambio, los pacientes afectados levemente, pueden presentar sólo manifestaciones cutáneas (Nordmann & Deybach, 1982).

La enfermedad se manifiesta en general en los primeros años de vida (a veces desde el nacimiento) aunque, como ya mencionamos, se han descrito algunos casos en pacientes adultos (Deybach et al., 1981; Moriguchi et al., 1989).

El diagnóstico de pacientes con PCE se realiza midiendo la actividad de Isomerasa en eritrocitos o cultivo de células; aunque el ensayo en eritrocitos es de valor limitado en pacientes transfundidos (Romeo et al., 1970; Deybach et al., 1980; Tsai et al., 1987).

La deficiencia en la actividad de Isomerasa, como sabemos es parcial, y aparentemente la cantidad residual de Isomerasa determinaría la severidad de la enfermedad; sin embargo, no es posible predecirla desde el punto de vista bioquímico.

BIBLIOGRAFIA:

BATLLE, A.: Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy - a model for carcinogenesis, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 20, 5-22, 1993.

BATLLE, A. & ROSSETTI, M.V.: Enzymic polymerization of porphobilinogen into uroporphyrinogens, *Int. J. Biochem.*, 8, 251-267, 1977.

BERMUDEZ MORETTI, M.; CORREA GARCIA, S.R.; CHIANELLI, M.S.; RAMOS E.H.; MATTOON, J.R.; BATLLE, A.: Evidence that 4-aminobutyric acid and 5-aminolevulinic acid share a common transport system into *Saccharomyces cerevisiae*, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27, 169-73, 1995.

BISSEL, D.M.: Laboratory evaluation in porphyria, *Semin. Liver Dis.*, 2, 100-107, 1982.

BONKOWSKY H.L: Porphyrin and heme metabolism and the porphyrias. En Zakim D, Boyer TD, eds. *A textbook of liver disease*. Philadelphia, WB Saunders, 351, 1982.

BRENNAN, MJ & CANTRILL, P.: Delta-Aminolaevulinic acid and amino acid neurotransmitters. *Mol Cell Biochem*, 38, 49-58, 1981.

BRENNER, D.A. & BLOOMER, J.R.: The enzymatic defect in variegate porphyria: studies with human cultured skin fibroblasts, *N. Engl. J. Med.*, 302, 765-769, 1980.

CRUCES-PRADO, M.; ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R.; HERNANDO, M.; PAYERO, M.; BELTRAN, T. & AGUILAR, A.: Two cases of infantile and familial porphyria cutanea tarda, *Dermatologica*, 161, 205-210, 1980.

DE VERNEUIL, H.; SASSA, S. & KAPPAS, A.: Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes, *J. Biol. Chem.* 258, 2454-2460, 1984.

DE VERNEUIL, H.; DEBEAUMONT, C.; DEYBACH, J.C.; NORDMANN, Y.; SAFAR, Z. & KASTALLE, R.: Enzymatic and immunological studies of uroporphyrinogen decarboxylase in familial porphyria cutanea tarda and hepatoerythropoietic porphyria, *Am. J. Hum. Genet.*, 36, 613-622, 1984.

DE VERNEUIL, H.; BOURGEOIS, F.; DE ROOIJ, F.; SIERSEMA, P.D.; WILSON, J.H.P.; GRANDCHAMP, B. & NORDMANN, Y.: Characterization of a new mutation (R292G) and a deletion at the human uroporphyrinogen decarboxylase locus in two patients with hepatoerythropoietic porphyria, *Hum. Genet.*, 89, 548-552, 1992.

DE VERNEUIL, H.; MOREAU-GANDROZ, F.; BENSIDHOUM, M.; HOMBRADOS, Y. & GED, C.: Porphyria cutanea tarda and hepatoerythropoietic porphyria: recent advances in molecular pathology en Polli, E.E. (eds.) *Molecular Bases of Human Diseases*, Elsevier Science, Amsterdam, 289-293, 1993.

DEAN, G.: *The Porphyrins. A story of inheritance and environment*. 2nd ed., Lippincott, Philadelphia, 1972.

DESNICK, R.J. & ANDERSON, K.E.: Heme biosynthesis and its disorders: Porphyria and sideroblastic anemias, en Hoffman, R.; Benz, E.J.; Shattil, S.J.; Furie, B.; Cohen, H.J., eds., *Hematology: Basic, Principles and Practice*, 2nd ed., New York: Churchill Livingstone, 523-545, 1995.

DEYBACH, J.C.; DE VERNEUIL, H.; PHUNG, N.; NORDMANN, Y.; PUISSANT, A. & BOFFETY, B.: Congenital erythropoietic porphyria (Günther's disease): Enzymatic studies on two cases of late onset, *J. Lab. Clin. Med.*, 97, 551-558, 1981.

DEYBACH, J.C.; GRANDCHAMP, B.; GRELIER, M.; NORDMANN, Y.; BOUE, J. & DE BERRANGER, P.: Prenatal exclusion of congenital erythropoietic porphyria (Günther disease) in a fetus at risk, *Hum. Genet.*, 53, 217-221, 1980.

DIAMOND, J.M. & ROTTER, J.I.: Observing the founder effect in human evolution, *Nature*, 329, 105-106, 1987.

DOSS, M.; VON TIEPERMANN, R.; SCHNEIDER, J. & SCHMID, H.: New type of hepatic porphyria with porphobilinogen synthase defect and intermittent acute clinical manifestation, *Klin Wochenschr*, 57; 1123- 1127, 1979.

ELDER, G.: Porphyrin metabolism in porphyria cutanea tarda. *Seminars in Hematology*, 14, 227-242, 1977.

FELSHER, B.; CARPIO, N & ENGLEKING, D.: Decreased hepatic uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda. *N. Engl. J. Med.*, 306, 766-769, 1982.

FUJITA, H.; SASSA, S.; TOBACK, A.C. & KAPPAS, A.: Immunochemical study of uroporphyrinogen decarboxylase in a patient with mild hepatoerythropoietic porphyria, *J. Clin. Invest.*, 79, 1533-1537, 1987.

GAREY, J.R.; FRANKLIN, K.F.; BROWN, D.A.; HARRISON, L.M.; METCALF, K.M. & KUSHNER, J.P.: Analysis of uroporphyrinogen decarboxylase complementary DNAs in sporadic porphyria cutanea tarda, *Gastroenterology*, 105, 165-169, 1993.

GAREY, J.R.; HANSEN, J.L.; HARRISON, L.M.; KENNEDY, J.B. & KUSHNER, J.P.: A point mutation in the coding region of uroporphyrinogen decarboxylase associated with familial porphyria cutanea tarda, *Blood*, 73, 892-895, 1989.

GÜNTHER, H.: Die Häematoporphyrin. Disch. Arch. Klin. Med., 105, 89-93, 1911.

HASSOUN, A.; VERTRAETEN, L.; MERCELIS, R. & MARTIN, J.: Biochemical diagnosis of an hereditary aminolevulinic acid dehydratase deficiency in a 63 year old man. J. Clin. Chem. Clin. Biochem, 27, 781-786, 1989.

HERMES-LIMA, M.; VALLE, V.; VERCESI, A. & BECHARA, E.: Damage to rat liver mitochondria promoted by delta aminolevulinic acid-generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead poisoning, Biochim. Biophys. Acta, 1056, 57-63, 1991.

ISHIDA, N.; FUJITA, H. & FUKUDA, Y: Message amplification phenotyping of an inherited δ -aminolevulinic acid dehydratase deficiency in a family with acute hepatic porphyria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 172, 237-245, 1990.

ISHIDA, N.; FUJITA, H. & FUKUDA, Y: Cloning and expression of the defective genes from a patient with δ -aminolevulinic acid dehydratase porphyria. J. Clin. Invest., 89, 1431-1440, 1992.

KAPPAS, A.; SASSA, S.; GALBRAITH, R.A. & NORDMANN, Y.: The porphyrias in Scriver, C.; Beaudet, A.; Sly, W. & Valle, D, eds., The Metabolic Basis of Inherited Diseases, N.Y. Mc Graw-Hill, pp. 2103-2159, 1989.

KOSZO, F.; ELDER, G.H.; ROBERTS, A. & SIMON, N.: Uroporphyrinogen decarboxylase deficiency in hepatoerythropoietic porphyria: further evidence for genetic heterogeneity. *Br. J. Dermatol.*, 122, 365-370, 1990.

KUSHER, J.; BARBUTO, A. & LEE, G.: An inherited enzymatic defect in porphyria cutanea tarda: decreased uroporphyrinogen decarboxylase activity, *J. Clin. Invest.*, 58, 1089-1097, 1976.

MORAN-JIMENEZ, M.J.; GED, C.; ROMANA, M.; ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R.; TAICH, A.; TOPI, G.; ALESSANDRO, L. & DE VERNEUIL, H.: Uroporphyrinogen decarboxylase: complete human gene sequence and molecular study of three families with hepatoerythropoietic porphyria, *Am. J. Hum. Genet.* 58, 712-721, 1996.

MORIGUCHI, Y.; TORIO, T.; YAMAMOTO, M.; TANOKA, T.; SEKI, Y. & IMANURA, S.: Late onset erythropoietic porphyria, *Br. J. Dermatol.*, 121, 255-262, 1989.

NAKAHASHI, Y.; FUJITA, H.; TAKETANI, S.; ISHIDA, N.; KAPPAS, A. & SASSA, S.: The molecular defect of ferrochelatase in a patient with erythropoietic protoporphyria, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89 (1), 281-285., 1992.

NORDMANN, Y. & DEYBACH, J.C.: Congenital Erythropoietic Porphyria, *Semin. Liver Dis.*, 2, 154-163, 1982.

PERCY, V.A.; LAMM, M.C.; TALJAARD, J. : Delta-Aminolaevulinic acid uptake, toxicity, and effect on [14C]gamma-aminobutyric acid uptake into neurons and glia in culture. *J Neurochem*, 36, 69-76, 1981.

PLEWINSKA, M.; THUNELL, S. & HOLMBERG, L.: δ -aminolevulinate dehydratase deficient porphyria: Identification of the molecular lesions in a severely affected homozygote. *Am. J. Hum. Genet.*, 49, 167-175, 1991.

ROBERTS, A.G.; ELDER, G.H.; ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R.; HERRERO, C.; LECHA, M. & MASCARO, J.: A mutation (G281E) of the human uroporphyrinogen decarboxylase gene causes both hepatoerythropoietic porphyria and overt familial porphyria cutanea tarda: biochemical and genetic studies on Spanish patients, *J. Invest. Dermatol.*, 104, 500-502, 1995.

ROMEO, G.; KABACK, M.M. & LEVIN, E.Y.: Uroporphyrinogen III cosynthetase activity in fibroblasts from patients with congenital erythropoietic porphyria, *Biochem. Genet.*, 4, 659-664, 1970.

STOKVIS, B.J.: Over twee zeldame kleuerstoffen in urine van zicken. *Ned. Tijdschr Geneesk*, 13; 409-411, 1889.

STRAND, J.; FELSCHER, B.F.; REDEKER, A.G. & MARVER, H.: Heme biosynthesis in intermittent acute porphyria: decreased hepatic conversion of

porphobilinogen to porphyrins and increased δ -aminolevulinic acid synthase activity Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 301, 67-75, 1970.

STROKA, J.; HILL, H.; KRIKAWA, J.; KOOLS, J. & BLOOMER, J.:
Immunochemical studies of ferroquelatase protein: characterization of the normal and mutant proteins in bovine and human protoporphyria, Am. J. Hum. Genet. 48 (1), 72-78, 1991.

TALJAARD, J.; LAMM, M.; TRUTER, L.; MCCARTHY, B.; PERCY, V &
NEETHLING AC: Mechanism of delta-aminolevulinic acid neurotoxicity, S. Afr. Med. J, 60, 180-183, 1981.

THUNELL, S.; HOLMBERG, L. & LUNDGREEN, J.: Aminolevulinate
dehydratase porphyria in infancy. A clinical and biochemical study, J. Clin. Chem. Biochem.; 25, 5-10, 1987.

TOBACK, A.C.; SASSA, S.; POH FITHZPATRICK, M.B.; SCHECHTER, J.;
ZAIDER, E.; HARBER, L.C. & KAPPAS, A.: Hepatoerythropoietic
porphyria:clinical biochemical and enzymatic studies in a three-generation family
lineage, N. Engl. J. Med., 316, 645-650, 1987.

TSAI, S.F.; BISHOP, D.F. & DESNICK, R.J.: Couple-enzyme and direct assays
for uroporphyrinogen III synthase activity in human erythrocytes and cultured
lymphoblasts, Anal. Biochem., 166, 120-133, 1987.

VERSTRAETEN, L.; VAN REGEMORTER, N.; PARDOU, A.; DE VERNEUIL, H.;
DA SILVA, V.; RODESCH, F.; VERMEYLEN, D.; DONNER, C.; NOEL, J.C.;
NORDMANN, Y. & HASSOUN, A.: Biochemical diagnosis of a fatal case of
Günther's disease in a newborn with hydrops faetalis, Eur. J. Clin. Chem. Clin.
Biochem., 31, 121-128, 1993.

CAPITULO IV

PSEUDOPORFIRIAS

	Página
IV.1. Introducción.....	105
IV.2. Pseudoporfiria en pacientes hemodializados.....	106
IV.2.1. Síntomas agudos en la pseudoporfiria aguda del hemodializado	107
IV.2.2. Alteración en la biosíntesis del hemo en la pseudoporfiria aguda del hemodializado.....	114
IV.2.3. Síntomas cutáneos en la pseudoporfiria cutánea del hemodializado	116
IV.2.4. Alteraciones de la biosíntesis del hemo en la pseudoporfiria cutánea del hemodializado.....	117
IV.3. Pseudoporfiria experimental.....	118
IV.4. Porfiria en pacientes hemodializados.....	121
IV.5. Bibliografía	124

IV. PSEUDOPORFIRIAS:

IV.1. INTRODUCCION:

Las pseudoporfirias no son enfermedades metabólicas, como su nombre lo expresa son una supuesta porfiria. Es decir, los pacientes pseudoporfíricos presentan síntomas clínicos semejantes a los portadores de la enfermedad genética (Poh-Fitzpatrick et al., 1989).

El nombre *pseudoporfiria*, en sus comienzos, fue empleado para describir las lesiones cutáneas, histológica y morfológicamente (Gilchrest et al., 1975; Korting et al., 1975; Keczkes, K. Et al., 1976; Burry & Lawrence, 1976; Thivolet et al., 1977) similares a las que exhiben los pacientes portadores de PCT familiar o esporádica (Mascaró et al., 1982); sin estar acompañadas por la clásica anormalidad bioquímica, es decir, un contenido elevado de porfirinas altamente carboxiladas en orina, plasma, glóbulos rojos y/o materia fecal (Batlle y Magnin, 1988).

La fragilidad cutánea y la presencia de ampollas en zonas expuestas a la luz solar es una de las características de la clínica en la pseudoporfiria (Shelly & Shelly, 1989; Suarez, 1990; Hazen, 1994).

Entre los factores asociados a estas manifestaciones dermatológicas, se encuentran algunos fármacos, tales como el

naproxeno (Judd et al., 1986; Howard et al., 1985), ciclosporina (Sola et al., 1987), amiodarona (Parodi et al., 1988), esteroides no inflamatorios (Taylor & Duffill, 1987), tetraciclinas (Epstein et al., 1976), ácido nalidixico (Zelickson, 1964; Birkett et al., 1969), furosemida (Burry & Lawrence, 1976); alta consumición de levadura (Lim et al., 1984) y el abuso de piridoxina (Baer & Stillman, 1984).

IV. 2 PSEUDOPORFIRIA EN PACIENTES HEMODIALIZADOS

Algunos casos de pseudoporfiria han sido documentados en la población con insuficiencia renal crónica y en particular los que están en tratamiento de hemodiálisis (Gilchrest et al., 1975; Korting et al., 1975; Keczkes & Farr, 1976; Thivolet et al., 1977; Brivet et al., 1978; Harber & Bickers, 1984). Sin embargo, la pseudoporfiria en los pacientes hemodializados si bien no es una porfiria, presenta alteraciones en la biosíntesis del hemo (Seubert et al., 1985; Anderson et al., 1987; Moore et al., 1990; Senger et al., 1991; Koszo et al., 1994).

Para un entendimiento más claro del cuadro clínico- bioquímico de la pseudoporfiria en el paciente hemodializado, recordaremos los signos característicos de estos pacientes que llevan a identificarla como pseudoporfiria aguda y/o cutánea.

IV.2.1. SINTOMAS AGUDOS EN LA PSEUDOPORFIRIA AGUDA DEL HEMODIALIZADO:

En la insuficiencia renal crónica, la filtración glomerular está disminuida, y por ello se acumulan en plasma y tejidos las moléculas que normalmente son filtradas por el órgano funcionante, principalmente la urea y creatinina, así como otros compuestos de bajo peso molecular y también las moléculas de gran tamaño (Carone, 1978; Bergstrom & Wehle, 1990).

Esto lleva entonces a alteraciones, tanto en el metabolismo nitrogenado, como en los productos de excreción, en el balance hidroelectrico y en otras funciones metabólicas (Chang et al., 1974; Bergstrom & Furst, 1976; Lutz et al., 1976; Asaba et al., 1983; Dukanovic et al., 1990; Kiley, 1990).

El riñón es un órgano endócrino involucrado en la producción de hormonas como la eritropoyetina o renina, relacionadas con la producción de sangre y la regulación del flujo sanguíneo, así como también con el metabolismo del calcio, vitamina D, óseo y a través de la prostaglandina con el tono vascular. Además, este órgano es fundamental para la formación y excreción de la orina, a través de la nefrona, que es la unidad funcional.

La nefrona está formada por el túbulo y el glomérulo renal. Los riñones eliminan normalmente la totalidad de los metabolitos provenientes del catabolismo nitrogenado o toxinas urémicas para mantener la concentración óptima de solutos en la sangre. También, los riñones, participan en la eliminación de moléculas de gran tamaño, entre las cuales están incluidas varios péptidos y proteínas de peso molecular menor de 50 kDa (Bright et al., 1836; Loge et al., 1958).

El riñón, entonces, normalmente cumple con tres funciones: metabólicas, endócrinas y excretoras.

La diálisis extracorpórea, terapia que se emplea en pacientes con insuficiencia renal crónica, es un proceso puramente físico que permite paliar, al menos en parte, la pérdida de la función excretora del riñón, pero no puede en modo alguno suplir la pérdida de las funciones endócrina y metabólicas que exigen la presencia de parénquima renal funcionante. Es por eso vital, pues permite mantener con vida al paciente urémico hasta que se encuentre el donante adecuado para su trasplante.

El funcionamiento de los riñones artificiales se basa en el principio de diálisis: el movimiento de solutos a través de una membrana semipermeable en una determinada dirección y concentración. En la diálisis extracorpórea la sangre, en una capa extremadamente delgada y uniforme, fluye a lo largo

de una cara de la membrana semipermeable. Una solución preparada, semejante al líquido extracelular normal, recorre con turbulencia la otra cara de la membrana, generalmente en dirección contraria al flujo sanguíneo.

Todo soluto dializable que tenga una elevada concentración sanguínea, sale de la sangre a favor de su gradiente de concentración; e inversamente, aquellas moléculas que están en alta concentración en el líquido de diálisis atraviesan la membrana semipermeable hacia la sangre. De esta forma la sangre así repuesta y purificada es devuelta a la circulación del paciente

La *hemodialisis* mejora la calidad de vida de los pacientes con insuficiencia renal crónica. El tratamiento comenzó a desarrollarse en la década del setenta y sigue hasta nuestros días. A fin de lograr una mayor eficiencia, se fue variando el número de horas de diálisis por semana y el área de la superficie activa de la membrana filtrante del equipo de diálisis (Hörl et al., 1985; Bergström & Wehle, 1987). Las mejoras del equipo y su técnica de aplicación ha llevado que haya pacientes que han recibido este tratamiento en forma continua por más de 15 años (Fernández et al., 1995).

Este tratamiento elimina principalmente las sustancias tóxicas urea y creatinina. Existen otras moléculas en el plasma que son difíciles de filtrar; y

que se acumulan en los tejidos (Carone, 1978; Maack et al., 1979), donde su concentración es proporcional a la reducción de la masa funcional del nefrón, produciendo en los pacientes hemodializados síntomas neurológicos y/o cutáneos; que se revierten en algunos casos, aumentando el tiempo de diálisis, variando la administración de fármacos o por trasplante renal (Lutz et al., 1974; Carone, 1978; Maack et al., 1979; Dukanovic et al., 1990; Fujisawa & Morishima, 1992; Jackson et al., 1995).

Los síntomas agudos en los pacientes hemodializados están frecuentemente asociados a la encefalopatía urémica, a la anemia, y a alteraciones funcionales del sistema nervioso central, que se manifiestan por astenia física e intelectual, dificultad para fijar la atención, irritabilidad, ansiedad, insomnio nocturno y somnolencia diurna, acompañados de desorientación, trastornos de la memoria, tendencia confusional (Kiley, 1990).

La anemia es un aspecto muy importante en el paciente con insuficiencia renal crónica y en tratamiento de hemodiálisis. La deficiencia relativa en eritropoyetina es una de sus causas más importantes; sin embargo, no debemos olvidar que por el mismo proceso mecánico, durante la hemodiálisis, el esqueleto del eritrocito sufre una pérdida de la constitución física llevando a un aumento en la fragilidad de su membrana que conduce a un deterioro celular que constituye así, otro de los factores conocidos de anemia (Fried, 1990).

Se asocian también, alteraciones neuromusculares, calambres, temblores y sacudidas musculares generalizadas. El electroencefalograma muestra una desorganización del ritmo alfa basal, con accesos de ondas lentas generalizadas. Los accidentes vasculares cerebrales de tipo hemorrágico (hemorragia meníngea o cerebromeníngea), a menudo mortales, son frecuentes en los pacientes hemodializados (Chachati et al,1987).

La Encefalopatía dialítica o "demencia dialítica" se caracteriza por el desarrollo progresivo de disastria, disimetría, temblores, mioclonias, trastornos de la memoria y del humor, psicosis alucinatoria y después por un estado demencial y convulsivo, que puede evolucionar hacia la muerte en un plazo medio de 6 meses, a pesar de la intensificación de las hemodiálisis (Burks et al,1976; Alfrey, 1986).

El síndrome de desequilibrio osmótico se debe a una velocidad de flujo rápido en la diálisis y puede determinar la aparición de las siguientes alteraciones: cefaleas, náuseas, vómitos, crisis hipertensiva, calambres, sacudidas musculares, agitación, temblores, desorientación,convulsiones generalizadas y, por último, coma. El líquido cefalorraquídeo está constantemente en hipertensión. Estas alteraciones son comúnmente reversibles en algunas horas. Sobrevienen sobre todo cuando la cifra inicial de urea sanguínea excede de 300mg/100ml: este hecho parece

sugerir la creación de un gradiente de concentración osmótico entre el cerebro y el plasma, debido a la lentitud de difusión de la urea fuera del compartimento celular (Maher et al, 1965).

Las disfunciones neurológicas, inducidas por drogas, están dadas por medicamentos normalmente eliminados por el riñón, que se acumulan en el plasma y los tejidos en el hemodializado, ya que la eliminación de los mismos en el curso de las hemodiálisis es generalmente baja (Chang et al., 1974; Lutz et al., 1974; Lutz, 1976; Bergstrom & Furst, 1976; Asaba et al., 1983; Dukanovic et al., 1990; Kiley, 1990; Fried, 1990).

Entre las alteraciones metabólicas y endócrinas se encuentran las del metabolismo fosfocálcico. Uno de los trastornos considerados como primarios es el defecto de conversión del 25-(OH)colecálciferol en el 1,25-(OH)₂ colecalciferol por riñón. La insuficiencia de dicho metabolito disminuye la absorción intestinal del calcio, provocando así una hipocalcemia, que induce, a su vez, la secreción de la hormona paratiroidea (PTH). La PTH es secretada por las glándulas paratiroideas como polipéptido simple de 84 aminoácidos. Se sintetiza vía una serie de precursores llamados pre-pro PTH, de 90 aminoácidos. En las células de las paratiroides ocurren una serie de cambios postraslacionales que llevan a la 1-84 PTH, que se almacena en gránulos intracelulares secretores.

La función principal de la PTH es elevar los niveles plasmáticos de Ca durante la hipocalcemia. A medida que disminuye la capacidad funcional de los nefrones, se produce un aumento de la concentración del fosfato sérico por alteración de su excreción; ese aumento va acompañado por una disminución de la calcemia. Como respuesta, las glándulas paratiroides elevan rápidamente la secreción de PTH, induciendo el retorno a los niveles adecuados de calcemia y estimulando la fosfaturia. Pero el aumento progresivo y permanente de PTH circulante durante el curso de la enfermedad, lleva al desarrollo de hiperparatiroidismo secundario que conduce a una excesiva resorción ósea. En plasma urémico se han identificado fragmentos de PTH, ausentes en plasma normal, que se han asociado a la neurotoxicidad presente en el síndrome urémico de los pacientes hemodializados (Hampers et al, 1968; Avram et al., 1976; Massry, 1977; Habener & Potts, 1978; Massry & Goldstein, 1978; Habener, 1981; Kudlac et al., 1994; Felsenfeld et al., 1995)

Durante el estadio de uremia grave aparece una intolerancia a la glucosa que se caracteriza por una curva de hiperglucemia de tipo paradiabético que no se corrige por hemodiálisis (Hostetter, 1985; Manis & Firedman, 1986).

Durante el curso de la hemodiálisis también hay alteración en los niveles de las vitaminas tipo solubles (Blumberg et al., 1983).

IV.2.2. ALTERACION EN LA BIOSINTESIS DEL HEMO EN LA PSEUDOPORFIRIA AGUDA DEL HEMODIALIZADO.

Se ha encontrado una falla parcial en la actividad del ALA-D en sangre de pacientes hemodializados (Fontanellas et al., 1996 b), al igual que ocurre en la Nueva Porfiria Aguda, tirosinemia, alcoholismo e intoxicación por plomo. Como consecuencia el ALA se acumula en plasma.

La hemodiálisis reduce el contenido plasmático de ALA en estos pacientes. Sin embargo, hasta ahora no se han logrado restablecer los valores normales del precursor con la hemodiálisis.

Con la hemodiálisis se recupera parcialmente la actividad del ALA-D en sangre de los pacientes hemodializados, este efecto tiene su explicación teniendo en cuenta las propiedades de esta enzima (Fontanellas et al., 1996 b).

Recordemos que el ALA-D es una enzima oligomérica, de sus 8 subunidades sólo 2 constituyen el dímero funcional. El zinc y grupos sulfhidrilos (-SH) juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura de ese dímero.

Es bien conocido que la actividad del ALA-D es inhibida por metales pesados como el plomo. La actividad del ALA-D en sangre es un sensible

indicador de la intoxicación por plomo. El plomo reemplaza al zinc en el sitio activo de la enzima, alterando la estructura del dímero funcional, y reduciendo la actividad del ALA-D. Se ha demostrado que por el agregado del zinc y por el tratamiento térmico con calor se restaura la actividad del ALA-D en sangre humana expuesta al plomo. Si bien, el contenido de zinc plasmático está disminuido en los pacientes hemodializados, no se ha encontrado una correlación entre la actividad del ALA-D y la concentración de zinc. Tampoco se ha encontrado en pacientes hemodializados contaminación y/o intoxicación con metales pesados, tales como el plomo.

El nivel de glutatión en sangre también está disminuido en pacientes hemodializados. Existe una clara correlación entre los niveles de actividad del ALA-D y los niveles de glutatión, que indica una alteración en el estado redox de la célula (Vanella et al., 1983; Wolff et al., 1993).

Otro de los factores que pueden alterar el ALA-D son las toxinas urémicas, y entre ellas la PTH (Stella et al., 1993). Se demostró un aumento de la concentración de PTH en plasma de pacientes hemodializados que se correlaciona con una disminución en la actividad del ALA-D en sangre.

El riñón normal excreta las proteínas de peso molecular inferior a 55 kDa a través de la fracción luminal y contraluminal, y son degradadas por las células de la parte proximal tubular. Por esta razón la uremia crónica sin tejido funcional, conduce a la acumulación de compuestos

biológicamente activos y potencialmente tóxicos de alto peso molecular conocidas como las "moléculas medias" (Chang et al., 1974; Dukanovic et al., 1990; Douglas & De Fronzo, 1990; Smolenski et al., 1993).

El tratamiento de la anemia con eritropoyetina llevó a la recuperación de la actividad del ALA-D de glóbulos rojos en pacientes hemodializados, pero no modifica la acción inhibitoria del plasma de pacientes hemodializados sobre la actividad de esa enzima (Fontanellas et al., 1996 a).

Algunos autores han observado que la actividad de la deaminasa en sangre de pacientes hemodializados está incrementada y se normaliza durante el tratamiento con eritropoyetina (Bottomley & Muller-Eberhard, 1988; Fontanellas et al, 1996 a).

De acuerdo a estos resultados la administración prolongada de eritropoyetina corregiría las alteraciones de las primeras etapas del camino metabólico del hemo, es decir a nivel del ALA-D y deaminasa.

IV. 2.3. SINTOMAS CUTANEOS EN LA PSEUDOPORFIRIA CUTANEA DEL HEMODIALIZADO:

Entre las lesiones cutáneas presentes en los pacientes hemodializados se incluye la aparición de ampollas subepidérmicas

(Gilchrest et al., 1975; Korting, 1975) en dorso de dedos, manos y antebrazos; acompañadas de erosiones superficiales y escaras pigmentadas. Además, están presentes edema y prurito (Stahle, 1989; Ostelere et al., 1994).

Algunos factores asociados a la crisis cutánea pseudoporfirica coinciden con la porfiria (Topi et al., 1980; Poh-Fitzpatrick et al., 1980; Batlle & Magnin, 1988; Stella et al., 1988; Suga & Ikezawa, 1995), entre ellos, ocupan un papel destacado, el desbalance de hierro corporal, el alcohol, ciertos fármacos como el fenobarbital y el compromiso hepático, con frecuencia asociado al virus de la hepatitis (Oesterreicher et al., 1995).

IV.2.4. ALTERACIONES DE LA BIOSINTESIS DEL HEMO EN LA PSEUDOPORFIRIA CUTANEA DEL HEMODIALIZADO.

Por fluorometría se ha encontrado un aumento entre 1,15 y 2,7 veces en el contenido de porfirinas plasmáticas en pacientes con insuficiencia renal crónica y en hemodializados sin historia de porfiria, respecto de los valores normales (Poh-Fitzpatrick, 1976; Seubert et al., 1985; Senger et al., 1991; Coronel et al., 1994; Siersema et al., 1995).

El patrón cromatográfico de estas porfirinas muestra un alto porcentaje de porfirinas altamente carboxiladas, con 8 y 7 carboxilos, semejante al que se observa en los casos de porfiria cutánea tardía (Stella et al., 1988).

Este aumento de porfirinas en plasma llevó a estudiar los niveles de la actividad de la uroporfirinógeno decarboxilasa (Uro-D) en los pacientes hemodializados con síntomas cutáneos (Stella et al., 1988; Mamet et al., 1995)

Los resultados mostraron que la diálisis no modifica *per se* la actividad de la Uro-D eritrocitaria, lo cual estaría indicando, que la presencia de las porfirinas en plasma se debería a alteraciones de la enzima hepática.

Recordemos que el hierro hepático juega un papel destacado en la expresión clínica y bioquímica de la PCT (Siersema et al., 1995a). Como se ha indicado el metal puede oxidar los porfirinógenos, verdaderos sustratos de la Uro-D a porfirinas. A su vez, las porfirinas tienen una gran capacidad para unirse a las proteínas y en especial a la Uro-D, inhibiéndola, provocando así la acumulación hepática del sustrato e intermediarios de la descarboxilación, que se oxidan o no *in situ*, y un aumento de su circulación plasmática con las manifestaciones cutáneas, como consecuencia de la acción fototóxica de las porfirinas (Smith & Francis, 1981; Mukerji et al., 1984).

IV. 3. PSEUDOPORFIRIA EXPERIMENTAL

Se ha señalado ya que entre los factores asociados a las manifestaciones dermatológicas del paciente hemodializado, se encontraron una serie de agentes farmacológicos, tales como el ácido nalidíxico (Birkett, 1969) que se ha empleado para el tratamiento de infecciones urinarias desde 1963 (Ramsay, 1974). El primer caso de erupciones fototóxicas debido a terapia con ácido nalidíxico ya se describió en 1964 (Zelickson, 1964).

El ácido nalidíxico es una quinolona derivada de la naftiridina (Figura IV.1).

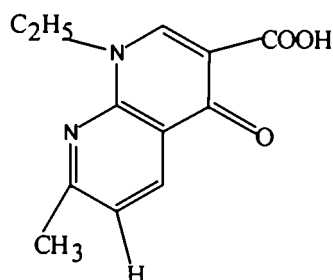


FIGURA IV.1: Estructura del ácido nalidíxico

Actúa sobre la síntesis del ADN durante la replicación bacteriana, inhibiendo la enzima Girasa. Aunque el ácido nalidíxico es bactericida para la mayoría de las bacterias gramnegativas comunes productoras de infecciones del tracto urinario, su actividad intrínseca es limitada.

Se requieren concentraciones del ácido que se acerquen a 20 mg/ml para destruir la mayoría de los bacilos gramnegativos entéricos.

El ácido nalidíxico administrado por vía oral se absorbe en casi su totalidad. Pueden alcanzarse concentraciones plasmáticas de 20 a 50 mg/ml, pero un 93 a 97 % está unido a las proteínas plasmáticas.

En el organismo, parte se convierte en un metabolito activo que aparece en la sangre antes de 30 minutos después de su ingestión alcanzándose el máximo nivel plasmático a las 2 horas. Se distribuye por todos los tejidos, especialmente en el riñón, aunque a concentraciones menores que en plasma.

Una vez ingerido parte del ácido nalidíxico se transforma por oxidación primero en ácido 7-hidroxinálidíxico; metabolito que conserva las propiedades antibacterianas, y luego en ácido dicarboxílico; el ácido nalidíxico y el metabolito activo se conjugan con el ácido glucurónico, inactivándose, y excretándose por orina. Parte del ácido nalidíxico se conjuga en el hígado. La vida media plasmática normalmente es de unas 8 horas, pero puede ser de hasta 21 horas en presencia de insuficiencia renal (Mandell et al., 1991).

Las foto reacciones debidas a esta droga, son clínicamente similares a una PCT. En algunos casos se encontró fragilidad epidérmica. Los

pacientes presentaban histopatológicamente, ampollas no inflamatorias subepidérmicas (Louis, 1973; Burry, 1974; Ramsay, 1974). En algunos enfermos, se observó la persistencia de la fotosensibilidad varios meses después de que se suspendió la administración de la droga. En ninguno de los casos relacionados con ácido nalidíxico se ha visto una evidencia bioquímica relacionada con una porfiria, por lo cual se lo considera como un buen modelo experimental de pseudoporfiria.

IV.4. PORFIRIA EN PACIENTES HEMODIALIZADOS:

El estudio del camino metabólico del hemo en pacientes en hemodiálisis, ha llevado a identificar verdaderos portadores de la PCT (Morán et al., 1995).

En estos casos, el patrón bioquímico muestra un elevado contenido de porfirinas en plasma, principalmente de 8, 7, 6, 5 y 4 carboxilos, sangre y materia fecal en los pacientes anúricos; mientras que en los oligúricos se acompaña con el patrón clásico de PCT. La Uro-D eritrocitaria puede ser normal o estar disminuída, según se trate de una PCT adquirida o hereditaria; respectivamente, para confirmar el diagnóstico de la última es necesario el estudio enzimático familiar (Topi et al., 1980; Suga & Ikezawa, 1995), acompañado con el genético.

La hipertrichosis es un síntoma común en estos pacientes, aparece pelo de tipo lanugo, pigmentado, largo y más grueso que el habitual en región frontal, temporal, malar, lóbulo de la oreja, cejas y brazos, como el descripto para PCT. Acompañan, fragilidad cutánea, hiperpigmentación y ampollas en las áreas de la piel expuestas al sol (Mascaró, 1982).

La expresión clínica de la PCT hereditaria como adquirida, raramente es espontánea, sino que generalmente está asociada con la respuesta del hígado frente a una serie de hepatotoxinas. Los factores que desencadenan la PCT en pacientes hemodializados son similares a los de los pacientes porfíricos sin falla renal.

En nuestro medio, el mayor porcentaje de pacientes porfíricos estudiados corresponden a casos de PCT, la asociación de esta enfermedad con insuficiencia renal crónica en hemodiálisis es relativamente baja (1 al 2 %); pero en los casos de pseudoporfiria cutánea encontrados oscilan entre el 10 y el 15 %.

El tratamiento de la PCT en estos pacientes es difícil, al ser anúricos u oligoanúricos la cloroquina u otras alternativas terapéuticas que permiten la eliminación urinaria de las porfirinas, no están indicadas. La anemia que acompaña a la insuficiencia renal también contraindica las flebotomías (Topi et al., 1981). La administración de S-adenosil-L- metionina oral (comprimidos), 12-15 mg/kg/día durante 3 semanas, reemplaza

efectivamente a las flebotomías en cuanto a la movilización y eliminación de hierro libre por vía biliar por formación de un aducto entre el glutatión y el metal en el hígado, además, el aumento de glutatión contribuye a la reactivación de la Uro-D hepática y a la metabolización de los porfirinógenos acumulados. Este tratamiento resultó efectivo para los pacientes hemodializados con PCT (Stella et al., 1988).

La plasmaféresis o series de columnas con carbón activado se han aplicado con diferentes resultados (Allen et al., 1975; Disler et al., 1982; McColl et al., 1986)

La administración de varios ciclos de desferrioxamina ha tenido buena respuesta, sin embargo cuando se interrumpía la droga las porfirinas plasmáticas aumentaban y reaparecían las lesiones cutáneas (Praga et al., 1987).

Otras de las formas empleadas para eliminar las porfirinas en pacientes con PCT en hemodiálisis, fueron la hemofiltración y la plasmaféresis, combinadas con la administración de bajas dosis de cloroquina (2 x 100 mg/ semana) y desferal (Seubert et al., 1987).

La diálisis extracorpórea mejora la calidad de vida de los pacientes con insuficiencia renal crónica, a pesar de los sufrimientos y limitaciones que el tratamiento produce. La mejor solución es el trasplante.

IV. 5. BIBLIOGRAFIA

ALFREY,A.: Dialysis encephalopathy, *Kidney Int.*, 18; 53-57, 1986.

ALLEN, B.R.; PARKER, S.; THOMPSON, C.G.; MOORE, M.R.; DARBY, F.J. & HUNTER, J.A.: The effect of treatment on plasma uroporphyrinogen levels in cutaneous hepatic porphyria, *Br. J. Dermatol.*, 93, 37-42, 1975.

ANDERSON, C.D.; ROSSI, E.; GARCIA P. & WEBB, P.: Porphyrin studies in chronic renal failure patients on maintenance hemodialysis, *Photodermatol.*, 14, 14-22, 1987.

ASABA, H.; ALVESTRAND, A.; FURST, P. & BERGSTROM, J.: Clinical implications of uremic middle molecules in regular hemodialysis patients, *Clin. Nephrol.*, 19, 179-187, 1983.

AVRAM, M.M.; FEINFELD, D.A. & HUATUCO, A.H.: Search for the uremic toxin. Decreased motor-nerve conduction velocity and elevated parathyroid hormone in uremia, *N. Engl. J. Med.*, 298, 100-104, 1976.

BAER, R.L. & STILLMAN, M.A.: Cutaneous skin changes probably due to piridoxine abuse (letter), *J. Am. Acad. Dermatol.*, 10, 527-528, 1984.

BATLLE, A. y MAGNIN, P.: Porfirias humanas y experimentales. Aspectos clínicos y bioquímicos. Acta Bioquímica Latinoamericana, 2^a Ed. Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires, Bs As., Arg., 1988.

BERGSTRÖM, J. & FURST, P.: Uremic middle molecules, Clin. Nephrol., 5, 143-152, 1976.

BERGSTRÖM, J. & WEHLE, B.: No change in corrected beta-microglobulin concentration after cuprophane hemodialysis, Lancet, 1, 628-629, 1987.

BERGSTRÖM, J. & WEHLE, B.: Plasma beta-microglobulin (beta-M) concentration before and after hemodialysis (HD) with eight different dialyzers, Blood purif. (Abstr), 5, 49, 1987.

BERGSTRÖM, J. & WEHLE, B.: Clinical implications of middle and larger molecules, en Clinical Dialysis, ALLEN, R.; NISENSEN, D.E.; GENTILE, R. (eds), 2nd ed., Norwalk, Connecticut/San Mateo. California, USA, 579-601, 1990.

BIRKETT, D.; GARRETS, M. & STEVENSON, C.: Phototoxic bullous eruptions due to nalidixic acid. Br. J. Dermatol. 81; 342-344, 1969.

BLUMBERG, A.; HANCK, A. & SANDER, G.: Vitamin nutrition in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD), *Clin. Nephrol.*, 12, 244-250, 1983.

BOTTOMLEY, S.S. & MULLER-EBERHARD, U.: Pathophysiology of heme synthesis, *Semin. Hematol.*, 25, 282-302, 1988.

BRIGHT, R.: Cases and observations illustrative of renal disease accompanied the secretion of albuminous urine, *Guy's Hosp. Rep.*, 1, 338, 1836.

BRIVET, F.; DRUEKE, T.; GUILLEMETTE, J.; ZINGRAFF, J. & CROSNIER, J.: Porphyria cutanea tarda-like syndrome in hemodialyzed patients, *Nephron*, 20, 258-266, 1978.

BURKS, J.; ALFREY, A. & HUDDLESTONE, J.: A fatal encephalopathy in chronic hemodialysis patients. *Lancet*, 1; 764-768, 1976.

BURRY, J.N.: Persistent phototoxicity due to acid nalidixic. *Arch. Dermatol.*, 109; 263, 1974.

BURRY, J.N. & LAWRENCE, J.R.: Phototoxic blisters from high furosemide dosage, *Br. J. Dermatol.* 94, 495-499, 1976.

CARONE, F.A.: Renal handling of proteins and peptides, *Ann Clin. Lab. Sci.*, 8, 287-290, 1978.

CHACHATI,A.; DECHENNE,C. & GORDON,J.:Increased incidence of cerebral hemorrhage mortality in patients with analgesic nephropathy on hemodialysis, *Nephron*, 45; 167-168, 1987.

CHANG, T.M.S.; MIFCHELSEN, M.; COFFEY, J.F. & STARK, A.: Serum middle molecule levels in uremia during long term intermittent hemoperfusions with the ACAC (coated charcoal) microcapsule artificial kidney, *Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, 20, 364-371, 1974.

CORONEL, A.; SANTOS, J.L.; HERRERO, J.A.; MORAN, M.J.; GUERRA, P.; TORNERO, F. & SALAMANCA, R.: Heme biosynthesis in uremic patients on CAPD, on HD, *Kidney Int.*, 45, 220-223, 1994.

DISLER, P.; DAY, R.S.; BURMAN, N.; BLEKKENHORST, G. & EALES, L.: Treatment of hemodialysis – related porphyria cutanea tarda with plasma exchange, *Am. J. Med.*, 72, 989-993, 1982.

DOUGLAS, S.J. & DE FRONZO, R.A.: Endocrine dysfunction in chronic renal failure, en *Clinical Dialysis*, ALLEN, R.; NISENSEN, D.E.; GENTILE, R. (eds), 2nd ed., Norwalk, Connecticut, San Mateo. California, USA, 458-493, 1990.

DUKANOVIC, L.; PETROVIC, J. & POTIC, J.: Middle molecular weight substances and uremic polyneuropathy, *Acta Med. Jugosl.*, 44, 2, 117-128, 1990.

EPSTEIN, J. H.; TUFFANELLI, D.L.; SEIBERT, S.S. & EPSTEIN, W.L.: Porphyrin-like cutaneous changes induced by tetracycline hydrochloride photosensitization, *Arch. Dermatol.*, 112, 661-666, 1976.

FELSENFELD, A.J.; JARA, A.; PAHL, M.; BOYER, J. & RODRIGUEZ, M.: Differences in the dynamics of parathyroid hormone secretion in hemodialysis patients with marked secondary hyperparathyroidism, *J.Am.S. Nephrol.*, 6, 1371-1378, 1995.

FERNANDEZ, J.M.; SCWEDT, E.; AMBROSONI, P.; GONZALEZ, F. & MAZZUCHI, N.: Eleven years of chronic hemodialysis in Uruguay: Mortality time course, *Kidney Int.*, 47, 1721-1725, 1995.

FONTANELLAS, B.S.; HERRERO, M.D.; MORAN, M.J.; CORONEL, F.; SEPULVEDA, P.; BARRIENTOS, A. & SALAMANCA, R.E.: Efficiency of three different hemodialysis membranes for plasma porphyrin removal, *Am. J. Kid. Dis.*, 25, 30-33, 1995.

FONTANELLAS, A.; HERRERO, J.A.; CORONEL, F.; SANTOS, J.L.; MORAN, M.J.; BARRIENTOS, A. & SALAMANCA, R.E.: Effects of recombinant human erythropoietin of porphyrin metabolism in uremic patients on hemodialysis, *J.Am. Soc. Nephrol.*, 7, 774-779, 1996 (a).

FONTANELLAS, A.; HERRERO, J.A.; TROBO, J.Y.; MORAN, M.J.; CORONEL, F.; BARRIENTOS, A. & SALAMANCA, R.E.: Abnormalities of heme biosynthesis in experimental acute renal failure, *J.Am. Soc. Nephrol.*, 7, 628-632, 1996 (b).

FRIED, W.: Hematologic aspects of uremia, en *Clinical Dialysis*, ALLEN, R.; NISENSEN, D.E.; GENTILE, R. (eds), 2nd ed., Norwalk, Connecticut/San Mateo. California, USA, 391-408, 1990.

FUJIAWA, S. & MORISHIMA, T.: Specific skin disorders in chronic kidney failure with hemodialysis?. *Nippon Rinsho*, 50, 423-428, 1992.

GILCHREST, B.; ROWE, J.W. & MIHM, M.C.: Bullous dermatosis of hemodialysis, *Ann Intern. Med.*, 83, 480-483, 1975.

HABENER, J.F. & POTTS, J.T.: Biosynthesis of parathyroid hormone, *N. Eng. J. Med.*, 299, 580-585. 1978.

HABENER, J.F.: Regulation of parathyroid hormone secretion and biosynthesis, *Ann. Rev. Physiol.*, 43, 211-217, 1981.

HAMPERS, C.L.; KATZ, A.J.; WILSON, R.E. & MERRILL, J.P.: Disappearance of uremic itching after subtotal parathyroidectomy, *N.Eng. J. Med.*, 279, 695-697, 1968.

HARBER,L. & BICKERS, D.R.: Porphyrinuria and pseudoporphyria, *J. Invest. Dermatol.*, 82, 207-209, 1984.

HAZEN, P.: Pseudoporphyria in a patient receiving carisoprodol/aspirin therapy, *J.Am. Acad. Dermatol.*, 31, 500, 1994.

HÖRL, W.H.; SCHAEFFER, R.M. & HEIDLAND, A.: Effect of different dialyzers on proteinases and proteinase inhibitors during hemodialysis, *Am. J. Nephrol.*, 5, 320-326, 1985.

HOSTETTER, T.H.: Diabetic nephropathy, *N. Engl. J. Med.*, 312, 642-643, 1985.

HOWARD, A.M.; DOWLING, J. & VARIGOS, G.: Pseudoporphyria due to naproxen (letter), *Lancet*, 1, 819, 1985.

JACKSON, P.; LOUGHREY, C.M.; LIGHTBODY, J.H.; McNAMEE, P.T. & YOUNG, Y.S.: Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure, *Clin. Chem.*, 41, 1135-1138, 1995.

JUDD, J. E.; HENDERSON, D.W. & HILL, D.C.: Naproxen- induced pseudoporphyria: a clinical and ultrastructural study, *Arch. Dermatol.*, 122, 451-454, 1986.

KECZKES, K. & FARR, M.: Bullous dermatosis of chronic renal failures, *Br. J. Dermatol.*, 95, 541-546, 1976.

KILEY, J.E.: Neurological aspects of dialysis, en *Clinical Dialysis*, ALLEN, R.; NISENSEN, D.E.; GENTILE, R. (eds), 2nd ed., Norwalk, Connecticut/San Mateo. California, USA, 535-558, 1990.

KLUDAC, H.; FIELDING, A.M. & WILLIAMS, A.J.: Effect of hemodialysis membrane type on parathyroid hormone removal, *Min. Elect. Metabolism*, 20, 245-249, 1994.

KORTING, G.W.: Über porphyria-cutanea-tarda-artige Langzeithämodialyse patienten, *Dermatologica*, 150, 58-61, 1975.

KOSZO, F.; FOLDES, M.; MORVAY, M.; JUDAK, R.; VAKIS, G. & DOBOZY, A.: Chronic hemodialysis – related porphyria/pseudoporphyria, *Orv. Hetil*, 131, 2131-2136, 1994.

LEBER, H.W.; DEBUS, E.; GRULICH, U. & SCHUTTERLE, G.: Potential role of middle molecular compounds in the development of uremic anemia, *Artif. Organs.*, 4, 63-67, 1981.

LIM, C.; RIDEOUT, J.M. & PETERS, T.J.: Pseudoporphyria associated with consumption of brewer's yeast, *Br. Med. J.*, 288, 1640-1642, 1984.

LOGE, J.P.; LANGE, R.D. & MOORE, C.V.: Characterization of the anemia associated with chronic renal insufficiency, *Ann. J. Med.*, 24, 4, 1958.

LOUIS, P.; WISKERMANN, A. & SCHULZ, K.H.: Bullous photodermatitis following nalidixic acid. *Hautartz*, 24; 445-448, 1973.

LUTZ, W.; MARKIEWICZ, K.; KLYSZEJKO, K. & STEFANOWICZ, L.: Investigations on the activity of lactic dehydrogenase and its inhibitors in the serum of uremic patients during hemodialysis., *Acta Med. Pol.*, 15, 397-401, 1974.

LUTZ, W.: The influence of strongly basic uremic peptide on liberation of lipoprotein lipase activity from human adipose cells, *Acta Med. Pol.*, 17, 55-70, 1976.

MAACK, T.; JOHNSON, V.; KAU, S.; FIGUEREDO, J. & SIGULEM, D.: Renal filtration, transport, and metabolism of low molecular weight proteins: A review., *Kidney Int.*, 16, 251-270, 1979.

MAHER, J. & SCHREINER, G.E.: Hazards and complications of dialysis. *N.Engl.J.Med.*, 273; 370-377, 1965.

MAMET, R.; GAFFER, U.; KORZETS, A. & SCHOENFELD, N.: Decreased uroporphyrinogen decarboxylase activity in patients with end stage renal disease undergoing hemodialysis, *Nephron*, 70, 202-206, 1996.

MANDELL, G.; SANDE, M.; RAUT, A. y TAYLOR, P. Agentes antimicrobianos. en *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. editores: GOODMAN y GILLMAN. New York USA ; 46, 1027-1034, 1991.

MANIS, Y. & FIREDMAN, E.A.: Current thinking on the management of uremic diabetic, *Semin. Nephrol.*, 6, 183-185, 1986.

MASCARO, J.M.; LECHA, M.; HERRERA, C.; MUNIESA, S. & SMITH, S.: Common and uncommon dermatological manifestations of porphyrias. A study based on our personal experience, en GARCI, S.A. (Eds.), XVI International Congress of Dermatology, Symposium of porphyrias, Tokyo, Madrid, 13-28, 1982.

MASSRY, S.G.: Is parathyroid hormone an uremic toxin?, *Nephron*, 19, 125-126, 1977.

MASSRY, S.G. & GOLDSTEIN, D.A.: Role of parathyroid hormone in uremic toxicity, *Kid. Int.*, 12, 395-397, 1978.

McCOLL, K.E.L.; SIMPSON, K.; YEUNG-LAIWAH, A.C.; THOMPSON, G.G.; McDOUGALL, A. & MOORE, M.R.: Haemodialysis related porphyria cutanea tarda. Treatment failure with charcoal haemoperfusion, *Photodermatology*, 3, 169-173, 1986.

MOORE, M.; McCOLL, K.E.; ; FITZSIMONS, E.J. & GOLDBERG, S.A.: The porphyrias, *Blood*, 4, 88-96, 1990.

MORAN, M.J.; FONTANELLAS, A.; SANTOS, J.L. & SALAMANCA, R.E.: Correlation between levels of free protein bound plasma porphyrin and urinary porphyrins in porphyria cutanea tarda, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 27, 585-588, 1995.

MUKERJI, S.K.; PIMSTONE, N.R. & BURNS, M.: Dual mechanism of inhibition of rat liver uroporphyrinogen Decarboxylase activity by ferrous iron: Its potential role in the genesis of porphyria cutanea tarda. *Gastroenterology*, 87, 1248-1254, 1984.

OESTERREICHER, C.; HAMMER, J.; KOCH, U.; PFEFFEL, G.; SUNDERPLASSMAN, G.; PETERMANN, D. & MULLER, C.: HBV and HCV genome in peripheral blood cells in patients undergoing chronic hemodialysis, *Kidney Int.*, 48, 1967-1971, 1995.

OSTELERE, L.; TAYLOR, C.; BAILLOD, R. & WRIGHT, S.: Relationship between pruritus transepidermal water loss, and biochemical markers of renal itch in haemodialysis patients, *Nephron. Dial. Transplant.*, 9, 1302-1304, 1994.

PARODI, A.; CABRERA, M. & REBORA, A.: Amiodarone induced pseudoporphyria, (letter), *Photodermatol.*, 4, 146-147, 1988.

POH-FITZPATRICK, M.B. & LAMOLA, A.A.: Direct spectrofluorometry of diluted erythrocytes and plasma. A rapid diagnostic method in primary and secondary porphyria, *J. Lab.Cli.Med.*, 362-370, 1976.

POH-FITZPATRICK, M.B.; MASULLO, A.S. & GROSSMAN, M.E.:
Porphyria cutanea tarda associated with chronic renal disease and
hemodialysis, *Arch. Dermatol.*, 116, 191-195, 1980.

POH-FITZPATRICK, M.B.; DARREL, M. & ELLIS, D.: Porphyria like bullous
dermatosis after chronic intense tanning bed and/ or sunlight exposure,
Arch. Dermatol., 125, 1236-1238, 1989.

PRAGA, M.; SALAMANCA, R.E.; ANDRES, A.; NIETO, J.; OLIET, A.;
PERPIÑA, J. & MORALES, J.M.: Treatment of haemodialysis-related
porphyria cutanea tarda with deferoxamine, *New Engl. J. Med.*, 316, 547-
548, 1987.

RAMSAY, C.A. & OBRESHKOVA, E.: Photosensitivity from nalidixic acid.
Br. J. Dermatol., 91; 523-528, 1974.

SENGER, E.; BERND, A.; KACHEL, H.G.; SCHOEPPE, W. &
HOLZMANN, H.: Porphyria cutanea uraemica: an obligate systemic
disease in chronic kidney insufficiency?, *Hautarzt*, 42, 764-769, 1991.

SEUBERT, S.; SEUBERT, A.; WOLFGANG RUMPF, K. & KIFFE, H.: A
porphyria cutanea tarda – like distribution pattern of porphyrins in plasma,
hemodialysate, hemofiltrate, and urine of patients on chronic hemodialysis,
J. Invest. Dermatol., 85, 107-109, 1985.

SEUBERT, S.; SEUBERT, A.; RUMPF, K.W. & IPPEN, H.: Treatment of porphyria cutanea tarda in a dialysis patient, *Boll. 1st. Derm. S. Gallicano*, 13, 90-94, 1987.

SHELLY, W.B. & SHELLY, E.D.: Blisters of fingertips, A variant of bullous dermatosis of hemodialysis, *J. Amer. Acad. Dermatol.*, 21; 1049-1051, 1989.

SIERSEMA, P.D., RADEMAKERS, L.H.P.; CLETON, M.Y.; TNEKATE, F.J.W.; DEBRUIJIN, W.C.; MARX, J.J.M. & WILSON, J.H.P.: The difference in liver pathology between sporadic and familial forms of porphyria cutanea tarda: The role of iron, *J. Hepatol.*, 23, 259-267, 1995 (a).

SIERSEMA, P.D.; DE-ROOIJ, F.W.M.; EDIXHOVENBOSDJK, A.; WEIMAR, A. & WILSON, J.H.P.: Heme synthesis in chronic renal failure: the effects of hemodialysis, peritoneal dialysis and erythropoietin treatment, *Nephron*, 71, 297-302, 1995 (b).

SMITH, A.G. & FRANCIS, J.E: Investigation of rat liver uroporphyrinogen decarboxylase. Comparisons of uroporphyrinogens I and III as substrates and the inhibition by porphyrins, *Biochem. J.*, 241, 50-61, 1981.

SMOLENSKI, O; TABAROWSKI, Z.; MISZTA, H. & DABROWSKI, Z.:
Effect of haemolysate and its peptide fractions on acetylcholinesterase
activity in erythrocytes from healthy subjects and patients on hemodialysis,
J.Am. Soc. Nephrol., 7, 774-779, 1996.

SOLA, R.; PUIG, LL., BALLARIN, J.A.; DONANTE, T. & DEL RIO, G.:
Pseudoporphyria cutanea tarda associated with cyclosporine therapy
(letter), Transplantation, 43, 772, 1987.

STAHLE, B.M.: Uremic pruritus. Clinical and experimental studies, Acta
Derm. Venerol., 145, 1-38, 1989.

STELLA, A.M.; MELITO, V.; PARERA, V.; COHAN, R.; HOYO, G.;
GARCIA DIAZ, R.; PIERINI, A.; FERRARIS, J. Y BATLLE, A.M. del C.:
Acerca de dos nuevos casos de porfiria cutánea tardía infantil en una niña
con leucemia y en un niño hemodializado en tratamiento con S-adenosil-
L-metionina, aspectos bioquímicos, Rev. Arg. Dermatol., 69, 118-124,
1988.

STELLA, A.M.; BINKER, M.; MELITO, V.; CARRIZO, P.; PARERA, V.;
TIZADO, M.; CANTAROVICH, M.; CANTAROVICH, F. & BATLLE, A.M.
del C.: Parathyroid hormone erythrocyte aminolaevulinic acid dehydratase
(ALA-D) and deaminase (D) in patients under dialysis, Netherlands J.
Med., 42, A26, 1993.

SUAREZ, S.R.; COHEN, P.R. & DELEO, V.: Bullous photosensitivity to naproxen: pseudoporphyria, *Arth. Rheumatism*, 33; 903-908, 1990.

SUGA,C. & IKEZAWA, Z.: Porphyria cutanea tarda in hemodialyzed patients, *Nippon Rinsho*, 53, 1484-1490, 1995.

TAYLOR, B.J. & DUFILL, M.B.: Pseudoporphyria from nonsteroidal antiinflammatory drugs, *N. Z. Med. J.*, 100, 322-323, 1987.

THIVOLET, J; EUVARARD, S.; PERROT, H.; MOSKOVTCHEKNO, J.F.; CLAUDY, A. & ORTONNE, J.P.: La pseudoporphyrie cutanée tardive des hémodialyses: aspects cliniques et histologiques à propos de 9 cases, *Ann Dermatol. Venerol.*, 104, 12-17, 1977.

TOPI, G.; D'ALESSANDRO GANDOLFO, L.; COSTAZA, F. & DE CANCARIN, G.C.: Porphyria and pseudoporphyria in hemodialyzed patients, *Int.J.Biochem.*, 12, 963-967, 1980.

TOPI, G.; D'ALESSANDRO, G.L.; CANCARINI, G.C.; DE CONSTANZA, F.; GRISO, D. & RAVELLI, M.: Porphyria cutanea tarda in haemodialysed patients, *Br. J. Dermatol.*, 104, 579-580, 1981.

VANELLA, A.; GEREMIA, E.; PINTURO, R.; TIRIOLO, P.; LIUZZO, G.; TIRIOLO, C.; CUSTORELLA, A.; CONDORELLI, G. & GILIO,

A.:Superoxide dismutase activity and reduced glutathion content in erythrocytes of uremic patients on chronic dialysis, Acta Haematol, 70; 312-315, 1983.

WOLFF, C.; BARRIA, M.S.; STELLA, A.M. y BATLLE, A.M.: Acido delta aminolevúlico dehidrasa en pacientes en programa de hemodiálisis, Bol. Hosp. S.J. De Dios, 40, 280-284, 1993.

ZELICKSON, A. S.: Phototoxic reaction with nalidixic acid (letter), JAMA, 190, 556-557, 1964.

CAPITULO V

AMINOACIDOS Y PROTEINAS

	Página
V.1. Generalidades	141
V.2. Secuencia y estructuras	143
V.3. Metodo de Sanger	144
V.4. Procedimientos para la secuenciación. Reacción de Edman.	146
V.5. Procedimientos para la secuenciación cuando el N-terminal está bloqueado.....	152
V.6. Bibliografía	155

V.1. GENERALIDADES

Las proteínas son macromoléculas fundamentales para el funcionamiento de las células. Presentan gran variabilidad estructural, representan cerca del 15 % del peso total del hombre y más de la mitad del peso seco de muchos seres vivos, en los cuales desempeñan distintas funciones biológicas tales como: actividad enzimática, transporte, nutrición, defensa inmunológica, regulación, entre otras.

Cada especie animal o vegetal está formada por millares de proteínas diferentes. Toda esa diversidad deriva de combinaciones de apenas 20 aminoácidos. El orden secuencial de los aminoácidos llega a ser tan crítico que un cambio de posición, una simple delección o inserción de un solo aminoácido, puede llevar a cambios considerables en las propiedades funcionales de la proteína.

Un ejemplo clásico, es el efecto dramático que produce la mutación de un solo aminoácido en la anemia falciforme (Figura V.1), una enfermedad genética humana.

Aunque no lo parezca, el número de posibilidades de combinación para los 20 aminoácidos (Tabla V.1) que constituyen las proteínas es muy

grande: si cada uno apareciera sólo una vez, se pueden esperar 2×10^8 secuencias posibles.

INDIVIDUO NORMAL ...Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu- Glu-Lys-...

INDIVIDUO ENFERMO...Val-His-Leu-Thr-Pro- Val-Glu-Lys-....

FIGURA V.1. : La cadena beta de la hemoglobina del individuo enfermo difiere en apenas un aminoácido con la del individuo normal, un glutámico ha sido reemplazado por una valina.

Tabla V.1.: Nombres y abreviaturas de los aminoácidos comunmente encontrados en las proteínas

NOMBRES	SIMBOLOS	
GLICINA	GLY	G
ALANINA	ALA	A
VALINA	VAL	V
ISOLEUCINA	ILE	I
LEUCINA	LEU	L
FENILALANINA	PHE	F
PROLINA	PRO	P
METIONINA	MET	M
TRIPTOFANO	TRP	W
CISTEINA	CYS	C
SERINA	SER	S
TREONINA	THR	T
ASPARAGINA	ASN	N
GLUTAMINA	GLN	Q
TIROSINA	TYR	Y
HISTIDINA	HIS	H
AC.ASPARTICO	ASP	D
AC.GLUTAMICO	GLU	E
LISINA	LIS	K
ARGININA	ARG	R

Las estructuras con pocas decenas de aminoácidos se llaman péptidos. En cambio las proteínas, son macromoléculas, con cadenas mayores, llamadas polipéptidos. Normalmente, presentan más de 50 residuos de aminoácidos, con repeticiones, lo que torna virtualmente ilimitada la posibilidad de formación de diferentes secuencias.

V.2. SECUENCIA Y ESTRUCTURAS

La secuencia de los aminoácidos combinados es muy importante, pues determina las propiedades de las proteínas, inclusive en lo relativo a las formas (globulares o fibrosas) que cada una puede asumir. Se cree que las proteínas que hoy componen cerca de 10 millones de especies de seres vivos existentes, representan menos de un milésimo de los tipos que, en algún momento, se formaron en nuestro planeta.

La secuencia de aminoácidos de cada proteína resulta de la traducción de la información genética contenida en el ácido desoxirribonucleico (ADN). Estas macromoléculas pueden estudiarse a varios niveles de complejidad, pero su estructura primaria, o sea, la secuencia de residuos aminoacídicos ligados en forma covalente, es prioritaria. Además de ésta, importa el estudio de la estructura secundaria (que resulta de la distribución espacial de los aminoácidos) y la terciaria (que resulta de los pliegues de la cadena en tres dimensiones) confiriéndole a estas moléculas formas esféricas y globulares.

Las proteínas que presentan más de una cadena polipeptídica se identifican como oligoméricas, por ejemplo la hemoglobina, que presenta cuatro cadenas (subunidades o protómeros) que caracterizan a la estructura cuaternaria (Morhy, 1989).

V.3. METODO DE SANGER

Frederick Sanger, fue el primero en determinar la secuencia de aminoácidos en una proteína, la insulina (Sanger & Thompson, 1963).

La estrategia de Sanger, que le valió el Premio Nobel, constituyó un avance fundamental para el conocimiento de la estructura proteica (Foltmann, 1981).

La Figura V.2., muestra la reacción de Sanger, en la cual el dinitrofluorobenceno (DNP) reacciona con el grupo amino del aminoácido N-terminal de la proteína. La DNP-proteína formada se hidroliza y el DNP-aminoácido (N-terminal) se identifica en cada paso por cromatografía.

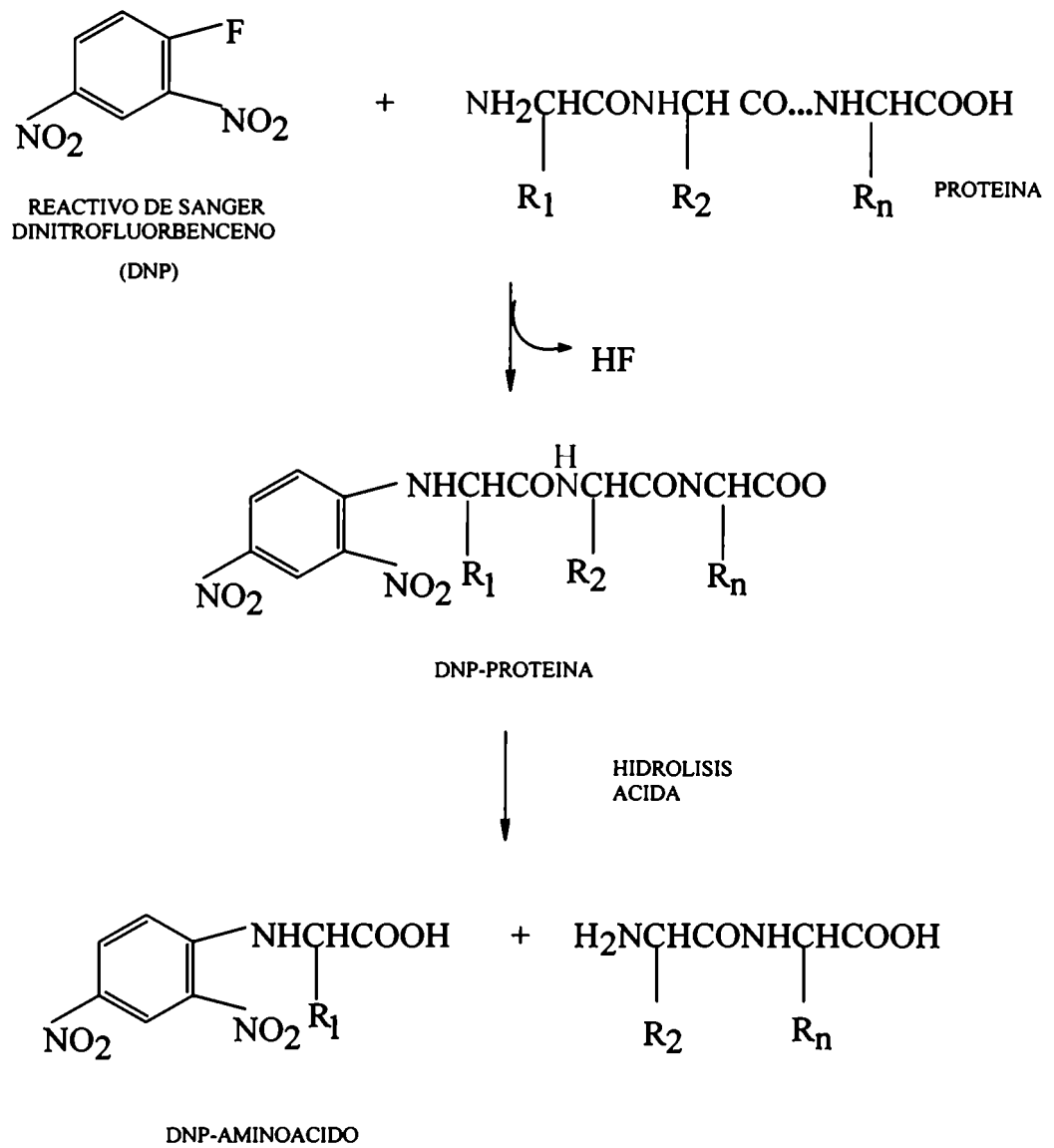


FIGURA. V.2.: Método de Sanger

V.4. PROCEDIMIENTOS PARA LA SECUENCIACION. REACCION DE EDMAN.

Los instrumentos empleados para la secuenciación automatizada de proteínas así como la metodología han sufrido una considerable evolución en los últimos años, con un gran desarrollo en cuanto a la sensibilidad y velocidad. Además de los instrumentos automatizados para la secuenciación en fase gaseosa juegan un papel fundamental para la obtención de datos precisos y válidos, el uso de columnas microbore para HPLC en la detección de los fenilhidantoína derivados de aminoácidos, la electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio y la transferencia electroforética a una membrana de polivinil difluoruro.

La Figura. V.3. muestra de manera esquemática, los procedimientos que se utilizan en la actualidad para la determinación de la secuencia de aminoácidos de una proteína simple.

El análisis de los aminoácidos es el primer paso en el estudio de la caracterización de proteínas, para ello la proteína pura se somete a una hidrólisis ácida, que produce la ruptura de las uniones peptídicas. La mezcla de aminoácidos así obtenida se analiza entonces por cromatografía, determinándose los aminoácidos presentes y las respectivas proporciones de los mismos, en un analizador automático de aminoácidos.

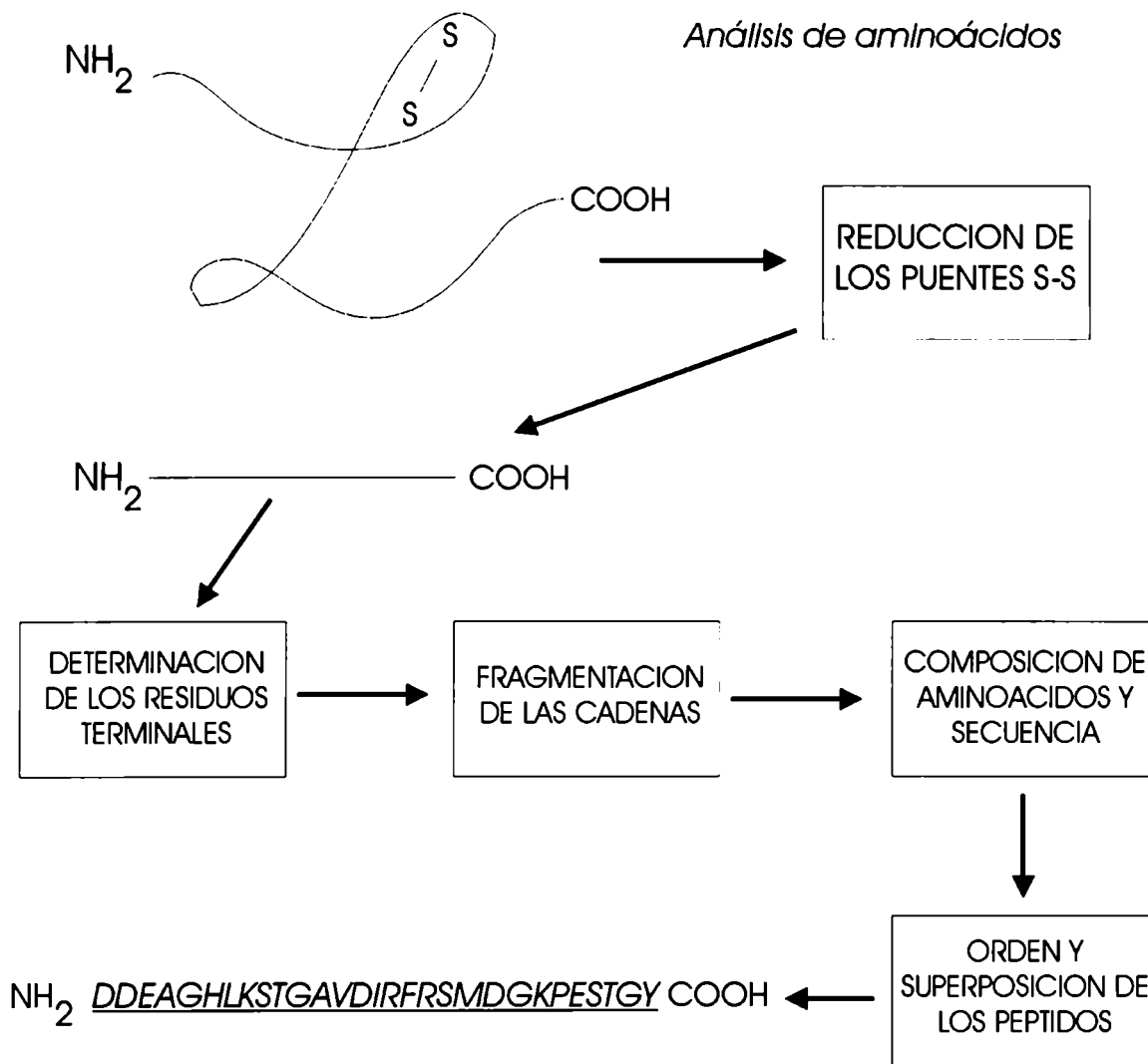


FIGURA V.3.: Esquema de los procedimientos empleados para la secuenciación de una proteína simple.

El análisis provee un importante parámetro cuantitativo en la caracterización de proteínas (Matsudaira, 1987). Debido a que se dispone de instrumentos altamente sensibles, que permiten la detección de aminoácidos en el orden de los picomoles, la preparación de la muestra para el análisis es de vital importancia.

El analizador de aminoácidos proporciona la composición de aminoácidos de una muestra en fase gaseosa, previa hidrólisis automática. La separación de los aminoácidos puede realizarse, según el equipo, por:

1) La reacción de acople de los aminoácidos con fenilisotiocianato (PITC) y posterior identificación de los feniltiocarbamil aminoácidos (PTC-derivados) resultantes, por cromatografía en fase líquida (fase reversa) (Figura V.4). Ofrece una alta sensibilidad, pudiendo detectar hasta 5 picomoles de cada aminoácido. Si las muestras contienen detergentes pueden obtenerse picos que son artefactos, que interfieren en la cuantificación.

2) Cromatografía de intercambio iónico del hidrolizado seguida de la reacción con ninhidrina. Es el utilizado generalmente para el análisis de rutina de aminoácidos (Foltmann, 1981).

Los requerimientos necesarios para la secuenciación de una proteína son varios, aunque pueden destacarse:

- No tener el N-terminal bloqueado. Sin embargo, aproximadamente cerca del 80% de las proteínas de mamíferos se encuentran naturalmente bloqueadas, generalmente por acetilación.

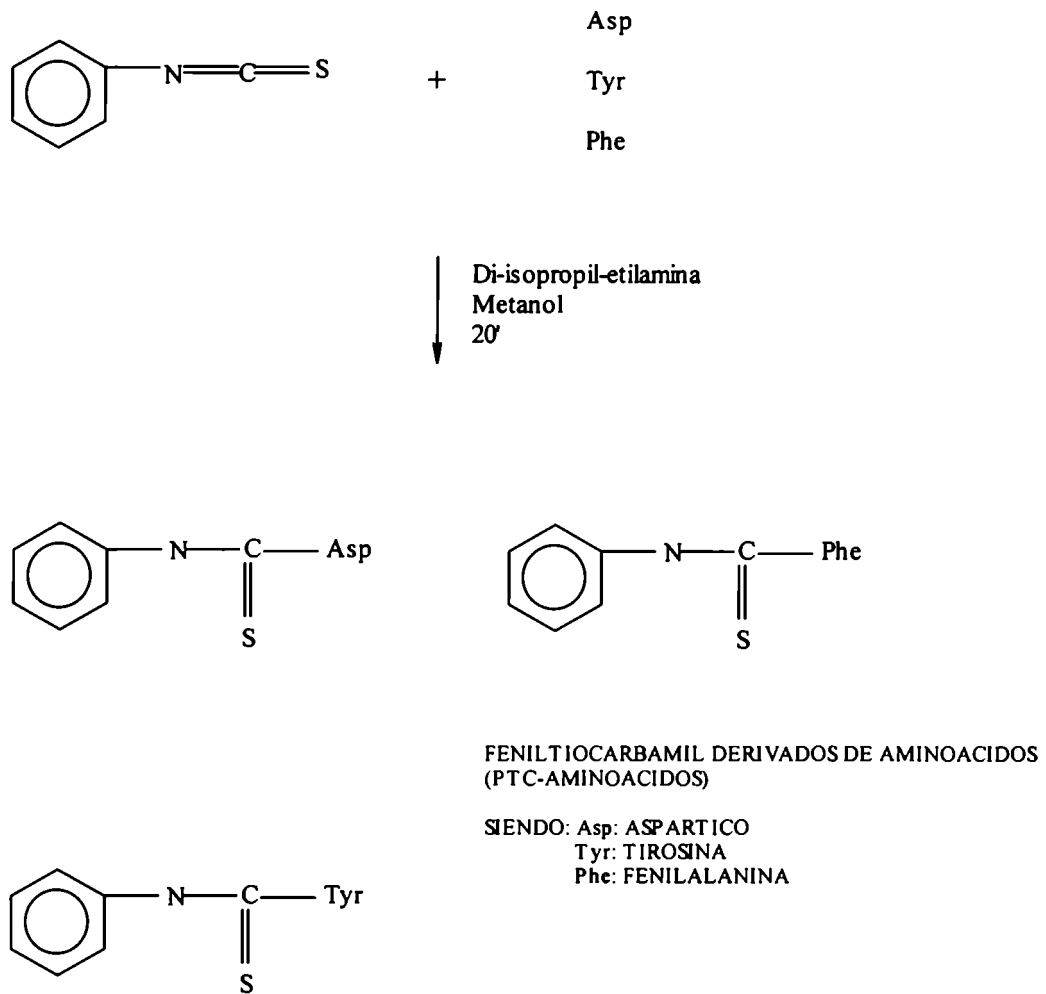


FIGURA.V.4.: Reacción de los aminoácidos con el fenilisotiocianato. ASP: Aspártico; TYR: Tirosina; PHE: Fenilalanina.

- Homogeneidad.
- No debe contener sales de buffers o componentes que reaccionen con el fenilisotiocianato (PITC)
- La concentración de dodecil sulfato de sodio debe ser < 1mg.
- Los residuos cisteína deben estar reducidos, alquilados u oxidados.

- Se necesitan más de 100 pmoles de material para un análisis óptimo (el equipo detecta entre 5-20 pmoles).

El secuenciador de péptidos y proteínas consta de una cámara de reacción y un frasco de conversión. Las proteínas se secuencian a partir de su N-terminal utilizando la reacción de Edman (Figura V.5) que se realiza en tres pasos: acoplamiento, clivaje y conversión.

El reactivo de Edman, fenilisotiocianato, se acopla al aminoácido terminal en la cámara de reacción y en el frasco de conversión la anilinothiazolinona lo convierte en el feniltiohidantoína derivado del aminoácido.

En cada ciclo de la reacción, se separa el residuo N-terminal del polipéptido y se identifica por HPLC, el polipéptido resultante con un nuevo N-terminal libre puede someterse a otro ciclo de reacción.

La mayoría de los laboratorios realizan esta reacción con secuenciadores en fase gaseosa. En estos instrumentos los reactivos utilizados para los pasos de acoplamiento y clivaje están en forma gaseosa.

El aparato puede analizar bandas proteicas en membranas o muestras líquidas sembradas en discos de polibreno. El péptido se mantiene unido al soporte durante los pasos de acoplamiento y clivaje.

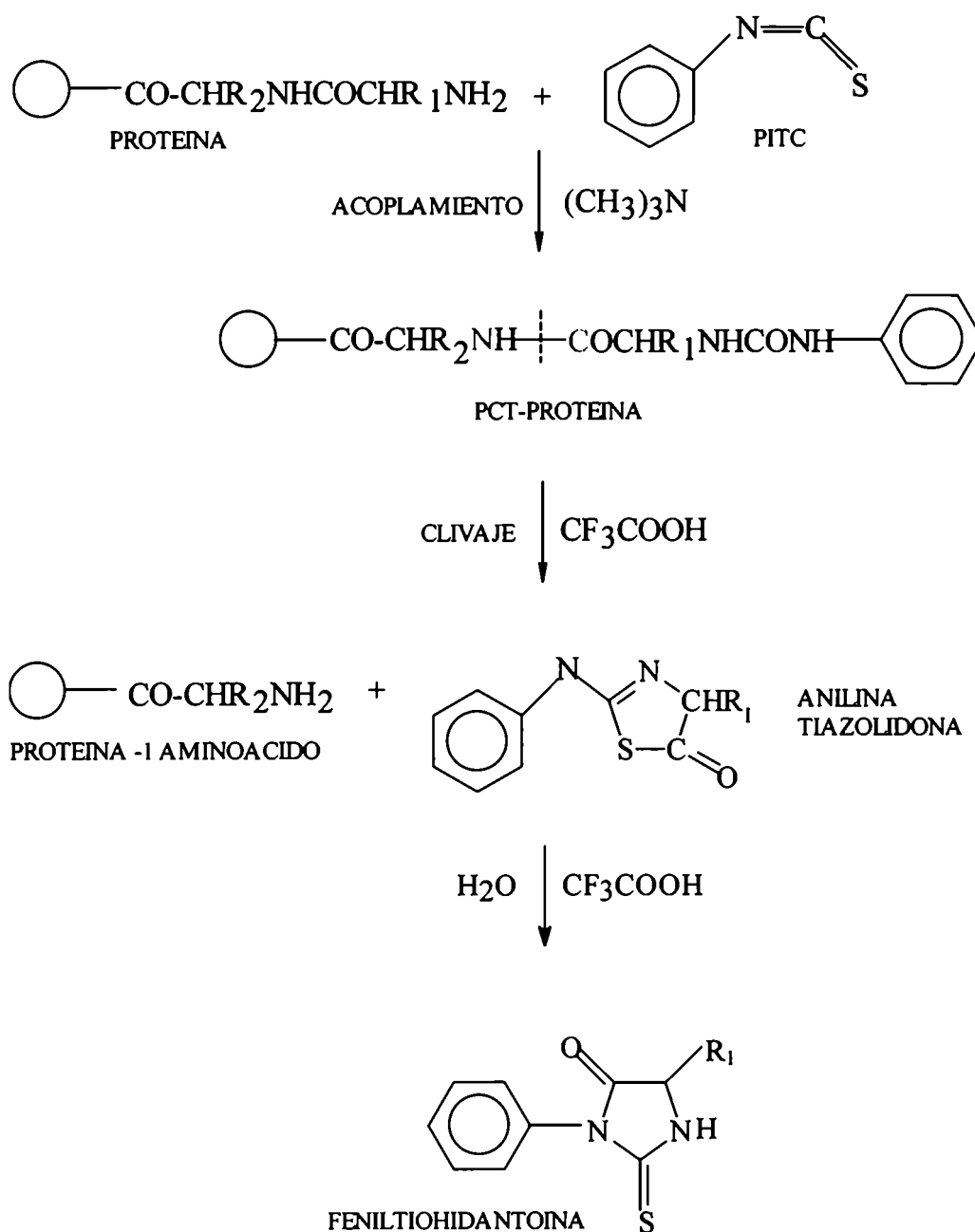


Figura V.5.: Reacción de Edman.

Este proceso ofrece la posibilidad de identificar 20-25 residuos con aproximadamente 50 picomoles de proteína.

Los PTH-aminoácidos generados durante cada ciclo secuencial se identifican por cromatografía en HPLC (fase reversa) y absorbancia en el espectro UV (269 nm).

V.5. PROCEDIMIENTOS PARA LA SECUENCIACION CUANDO EL N-TERMINAL ESTA BLOQUEADO.

Cuando la secuencia N-terminal de la proteína a analizar se encuentra bloqueada o cuando no es posible analizar secuencias internas, es necesario efectuar un clivaje químico o proteolítico.

Una alternativa es el clivaje con bromuro de cianógeno de proteínas inmovilizadas en membranas de polivinil difluoruro. Este reactivo cliva la secuencia polipeptídica específicamente luego de residuos metionina.

Debido a que metionina es un aminoácido que se presenta en baja proporción en las proteínas, se obtienen fragmentos de mayor peso molecular que los producidos por proteólisis.

La estrategia para el tratamiento de muestras proteicas que poseen el N-terminal bloqueado se muestra en la Figura V.6. En el caso de la electroelución de la Figura V.6, se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) de la muestra proteica. La banda proteica a secuenciar se electroeluye del gel. La proteína electroeluída y concentrada, se transfiere a una membrana de polivinil difluoruro desde un SDS-PAGE.

Por último, se produce la ruptura de la proteína inmovilizada en la membrana, mediante enzimas o reactivos químicos.

Cuando se realiza el clivaje en gel (opción 2 – Figura V.6), el clivaje de la proteína se efectúa en el SDS-PAGE, mientras que en la opción 3 se realiza un blotting a PVDF de la banda proteica que se encuentra en el gel. Luego se realiza la ruptura de la proteína en la membrana por los métodos convencionales. Se observa que el camino a seguir depende del tipo, pureza y cantidad de muestra.

Recientemente, Hirano y col. (1993), han propuesto una técnica que permite desbloquear el N-terminal de proteínas bloqueadas con grupos acetilo, formilo o piroglutámico, lo cual abre nuevos horizontes en la caracterización de proteínas, ya que haría posible el análisis secuencial, directamente a partir del N-terminal.

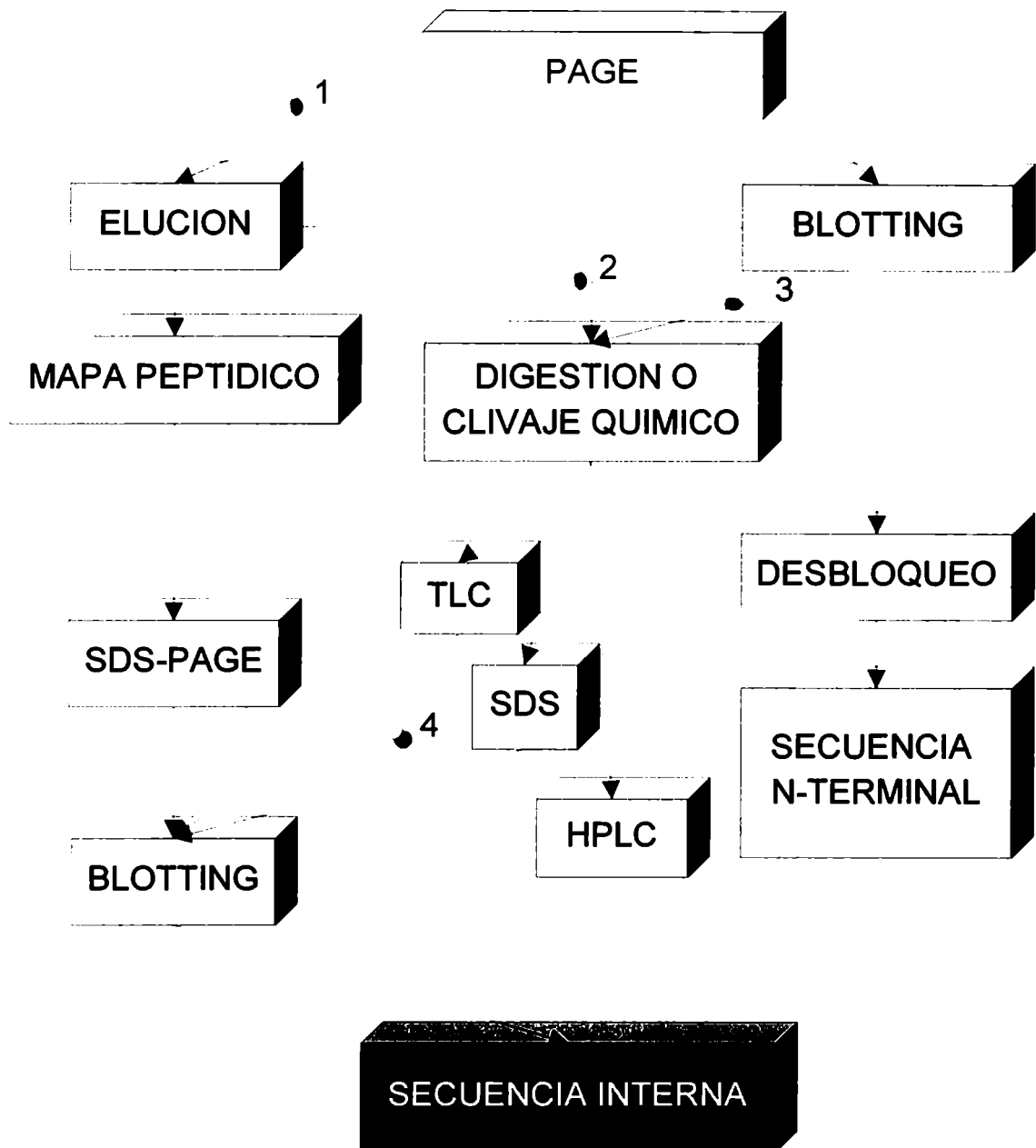


FIGURA V.6: Estrategia para determinar la secuencia de aminoácidos de una proteína con el N-terminal bloqueado. 1-electroelución; 2-clivaje en gel; 3- clivaje en membrana; 4- separación de los péptidos.

BIBLIOGRAFIA

FOLTMANN, B.: Protein sequencing: past and present. *Biochem. Educ.*, 9; 2-7, 1981.

HIRANO, H.; KOMATSU, S.; KAJIWARA, H.; TAKAGI, Y & TSUNAWA, S. Microsequence analysis of the N-terminally blocked proteins immobilized on polyvinylidene difluoride membrane by western blotting. *Electrophoresis*, 14; 839-846(1993).

MATSUDAIRA, P.: Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted to polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262, 10035-10041, 1987.

MORHY, L.: Sequenciamento de proteínas. *Ciencia hoje*. 53, 48-56, 1989.

SANGER, F. & THOMPSON, E.: The amino acid sequence in the glycol chain of Insulin. *Biochem. J.*, 53, 353-374, 1963.

**MATERIALES Y
METODOS**

CAPITULO VI

MATERIALES Y METODOS

	Página
VI.1. Reactivos:.....	156
VI.2. Materiales.....	156
VI.2.1. Animales.....	156
VI.2.1.1. Eritrocitos.....	157
VI.2.1.2. Hígados y riñones.....	157
VI.2.1.3. Purificación del ALA-D de hígado porcino.....	158
VI.2.2. Material humano.....	159
VI.2.2.1. Eritrocitos.....	159
VI.2.2.1.1. Purificación del ALA-D de eritrocitos.....	160
VI.3. METODOS.....	161
VI.3.1. Determinación de las actividades enzimáticas.....	161
VI.3.1.1. ALA-D en glóbulos rojos de pacientes hemodializados y controles.....	161
VI.3.1.2. PBG-D en glóbulos rojos.....	163

VI.3.1.3.	URO-D en glóbulos rojos	164
VI.3.1.4.	Unidad enzimática	165
VI.3.2.	Determinación de proteínas.....	165
VI.3.3.	Determinación de ALA y PBG en plasma	166
VI.3.4.	Determinación de porfirinas en plasma	167
VI.3.5.	Calentamiento, tratamiento con tripsina y TCA del plasma ..	168
VI.3.6.	Determinación de glutatión reducido y oxidado	169
VI.3.7.	Determinación de porfirinas en orina	171
VI.3.8.	Determinación del peso molecular	172
VI.4.	Modelo experimental de pseudoporfiria.....	173
VI.5.	Aislamiento, purificación, análisis y secuencia de aminoácidos del inhibidor:	175
VI.5.1.	Purificación del inhibidor.....	175
VI.5.2.	Determinación de la capacidad inhibitoria del inhibidor:	176
VI.5.3.	SDS-PAGE en minigeles:.....	177
VI.5.4.	Tinción de minigeles con coomasie-blue.....	178
VI.5.5.	Tinción con plata de minigeles	179
VI.5.6.	SDS-PAGE para el aislamiento del inhibidor.....	180
VI.5.7.	Electroelución de la banda proteica del inhibidor	181
VI.5.8.	Electrotransferencia de la proteína a polivinil difluoruro (PVDF)	183
VI.5.9.	Análisis de aminoácidos	185
VI.5.10.	Secuenciación del inhibidor	186
VI.5.11.	Clivaje con BrCN del inhibidor inmovilizado en PVDF	186

VI.5.12. Desbloqueo del N-terminal del inhibidor inmovilizado en PVDF	187
VI.5.13. Aislamiento químico de una secuencia única desde una mezcla de polipéptidos	189
VI.5.14. Aislamiento de péptidos para microsecuenciación por digestión proteolítica en SDS-PAGE.....	189
VI.6. Determinación del Km y el Ki	191
VI.7. Análisis estadístico de los resultados.....	192

VI.1. REACTIVOS

El ácido 5-aminolevulínico (ALA), seroalbúmina bovina (Fraction V), marcadores de P.M., Sephadex G-100, tripsina, Dodecil sulfato de sodio (SDS) , ácido 3-ciclohexilamino-1 propanosulfónico (CAPS) fueron de Sigma Chemical Co., USA. El Immobilon P fue de Millipore Corporation, Bedford, MA, USA, las columnas PD-10 de Pharmacia, Uppsala, Suecia. Los otros reactivos de grado analítico, fueron de Merck y Mallinckroot. El ácido nalidíxico fue cedido gentilmente por los laboratorios Farmasa (B.A.).

VI.2. MATERIALES

VI.2.1. ANIMALES

Se utilizaron ratones hembras CF1, de 25 días y un peso promedio de 30 – 35 g.



FIGURA VI.1 :RATONES CEPA CF1

VI.2.1.1. ERITROCITOS:

La sangre se extrajo por punción cardíaca.

Los ratones se inyectaron 20 minutos antes del sacrificio, con heparina 0,125 mg/gr de peso corporal, intraperitonealmente.

A 1 ml de sangre entera heparinizada de cada ratón de los distintos grupos se agregó 0,2 ml de Tritón X 100 5% y 3,8ml de Tris - HCl 0.05 M pH = 7,4. El sistema resultante se empleó inmediatamente para determinar la actividad del ALA-D.

VI.2.1.2. HIGADOS Y RIÑONES:

Cada órgano perfundido, se homogeneizó en sacarosa 0,25 M (en una relación 1:10 p/v) empleando un homogeneizador Ultraturrax Janke Pkunke , Ika- Labortechnik TP 18/10 adaptado con reóstato Thyristor Rigler TR - 50.

El homogenato se centrifugó durante 15 minutos a 15000 x g en una centrífuga Sorvall OTD 65 B; y el sobrenadante se utilizó como fuente enzimática, a 4 °C.

VI.2.1.3. PURIFICACION DEL ALA-D DE HIGADO DE CERDO

El hígado se conservó a - 20 °C en trozos de aproximadamente 100 g, la purificación se llevó a cabo según Fukuda (1993).

Se partió de 100 g de hígado, se cortó en trozos pequeños y se lavó con solución fisiológica. A continuación se secó sobre papel de filtro y homogeneizó en un potter Elvehjem (con tubo de vidrio y émbolo de teflón), en una solución de sacarosa 0,25 M., en una relación 10 % peso de tejido/volumen. El homogenato resultante se centrifugó a 15.000 x g durante 20 minutos en una centrífuga Sorvall OTD 65 B.

Al sobrenadante resultante, se le realizó un tratamiento térmico calentando a 56 - 58 °C con agitación constante en baño maría durante 5 minutos. Luego se lo enfrió inmediatamente en baño de hielo y centrifugó durante 15 minutos a 15.000 x g. El precipitado se descartó. Al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio finamente dividido hasta llegar a un 30 % de saturación, manteniendo el pH entre 6,8 - 7,0 mediante el agregado de hidróxido de amonio concentrado. La mezcla se dejó agitando durante 45 minutos y luego se centrifugó 20 minutos a 15.000 x g.

El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio entre 30 - 50 % de saturación. El precipitado se conservó a -20 °C hasta su uso.

VI.2.2. MATERIAL HUMANO

Los estudios se llevaron a cabo sobre sangre de 128 pacientes con insuficiencia renal crónica en tratamiento regular de hemodiálisis (por períodos de 2 a 192 meses) cuyas edades oscilaron entre los 21 y 65 años y sangre de 40 individuos controles sanos (edades entre 20 y 45 años).

El proceso de hemodiálisis se realizó durante 4 horas, en un sistema de paso simple con una membrana de cuprophane (sup: 1.4 m²), contra buffer bicarbonato.

La población de pacientes hemodializados y controles estudiados fueron no alcohólicos, no diabéticos, no estuvieron expuestos al plomo y no presentaban síntomas cutáneos.

VI.2.2.1. ERITROCITOS

La sangre se recogió sobre 0,1 ml de heparina (12,5 mg/ml de solución fisiológica) y se separaron los glóbulos rojos (GR) del plasma por centrifugación.

Se hemolizaron 0,5 ml de GR con el agregado de 5% de Tritón X-100 (5:1 v/v). Luego, los GR se diluyeron con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 (1:15 v/v) mezclando manualmente sobre hielo hasta completar la suspensión. Las determinaciones enzimáticas se realizaron inmediatamente después de preparado el sistema.

VI.2.2.1.1. PURIFICACION DEL ALA-D DE ERITROCITOS

Para la purificación del ALA-D eritrocitaria, se partió de 500 ml de sangre anticoagulada con citrato de sodio, proveniente del banco de sangre del Hospital Fernández. La purificación se llevó a cabo según Bustos et al. (1980), con algunas modificaciones. La sangre se centrifugó durante 15 minutos a 5000 rpm y el plasma se descartó. La hemólisis de los glóbulos rojos se realizó por congelamiento y descongelamiento. El hemolizado se trató con DEAE celulosa para eliminar la hemoglobina. La resina se trató previamente con distintos reactivos : NaOH 0.1 N, Hcl 0.1 N, H₂O , etanol, NaCl 0.5 N y con Buffer I (Buffer fosfato salino 3 mM pH: 6.8 que contenía acetato de zinc 1mM, β-merdptoetanol 10 mM).

Se separó la hemoglobina, por tratamiento de la resina con Buffer II (buffer fosfato salino 134 mM que contenía acetato de zinc 1 mM y β-merdptoetanol 10 mM). La precipitación salina se realizó con sulfato de amonio en dos etapas, la primera de ellas a una saturación entre 0 -

35 % y la segunda entre 35 - 55 %. El precipitado resuspendido en buffer fosfato 0,05 M se dializó contra buffer fosfato 0,05 M.

VI. 3. METODOS

VI.3.1. DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

VI.3.1.1. AMINOLEVULICO DEHIDRASA EN GLOBULOS ROJOS DE PACIENTES HEMODIALIZADOS Y CONTROLES

La actividad de ALA-D se midió según el método de Batlle et al.(1967). El sistema standard de incubación contenía 0,25 ml de solución enzimática; 0,25 ml de buffer fosfato de sodio 0,2 M pH 6.8 ; 0,5 ml de ALA 0,05 M y 0,45 ml de agua destilada. Las determinaciones se realizaron por duplicado. Se incubó 1 hora a 37 °C en oscuridad y con agitación mecánica. Se realizaron blancos de enzima, conteniendo solamente la solución enzimática y buffer.

La reacción se detuvo por el agregado de 0,1 ml de TCA 50%. Las proteínas precipitadas se separaron por centrifugación a 2000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga clínica Rolco CM 36, y en el sobrenadante se midió el PBG formado por la técnica de Moore y Labbe (1964), para lo cual se mezclaron volúmenes iguales (0.5 ml) de sobrenadante y reactivo de Ehrlich a temperatura ambiente, y a los 8

minutos se leyó la absorbancia a 555 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV- 210A.

Los n moles de PBG se calcularon según la siguiente fórmula:

$$n \text{ moles/ml} = (A_m - A_b) \times 2,57$$

Donde: A_m = Absorbancia de la muestra a 555 nm.

A_b = absorbancia del blanco a 555 nm.

2,57 = factor

Para el estudio del efecto inhibitorio del plasma sobre la actividad del ALA-D, se añadió 0,25 ml ó 0,5 ml de plasma, al sistema de incubación, y se varió la cantidad de agua de manera que el volumen final fue de 1,0 ml.

Para el estudio del efecto del Zn^{+2} sobre la actividad del ALA-D, se añadieron iones Zn^{+2} (como acetato de zinc) en concentraciones desde los 0,45 hasta 900mM.

Para el estudio de la influencia de la temperatura en la actividad del ALA-D, los hemolizados de glóbulos rojos se calentaron a 37, 40 y 60 °C durante 5 minutos, según Tomokuni (1975), y luego se determinó la actividad. La actividad de los controles y de los pacientes hemodializados realizada a 37 °C se consideró como 100%.

VI.3.1.2. PBG-D EN GLOBULOS ROJOS

Se determinó por el método de Batlle et al.(1978). El sistema de incubación contenía 0,5 ml de G.R. hemolizados, 0,15 ml de buffer Tris-HCl 0,5 M pH 8,2, 0,25 ml de la mezcla NaCl:MgCl₂ (7:3, v:v) y 30 µg de PBG (en 0,1 ml de buffer Tris-HCl 0,05M pH 8,2) en un volumen final de 1,5 ml. Las incubaciones se realizaron en oscuridad, en forma aeróbica, a 45 °C durante 2 hs. Se realizaron blancos de enzima y sustrato. Luego de la incubación, se añadió al sistema 1,5 ml de TCA. El sistema de incubación se iluminó con luz blanca durante 20 minutos, para oxidar los porfirinógenos formados, las proteínas se separaron por centrifugación a 2000g durante 15 minutos; y el contenido total de porfirinas se determinó en la solución por espectrofotometría (Rimington, 1960).

Cálculo

$$\frac{\text{Nmoles porfirinas}}{\text{ml GR}} = \frac{[2 A^{\text{max}} - (A^{380} + A^{430})] \times V \times 30}{0,992}$$

Donde:

- A = Absorbancia
- V = Volumen de la solución ácida
- 30 = Factor de dilución
- 0,992 = Factor para la Uro

IV.3.1.3. DETERMINACIÓN DE URO-D ERITROCITARIA

La actividad de la enzima URO-D se llevó a cabo de acuerdo a Afonso et al. (1985).

El sistema standard de incubación contenía: 1 ml de sangre hemolizada, 30 μ g uroporfirinógeno III, buffer fosfato de sodio 0,067 M pH 7; GSH 0,1 mM; EDTA 0,1 mM y agua destilada hasta completar un volumen de 3 ml.

La incubación se realizó en anaerobiosis, oscuridad, con agitación constante a 37 °C, durante 60 minutos. La reacción se detuvo con TCA hasta llegar a una concentración de 5%. Los porfirinógenos presentes se oxidaron a porfirinas por exposición a luz blanca durante 20 minutos. Las porfirinas presentes se midieron espectrofotométricamente. Luego se llevaron a sequedad en desecador al vacío en NaOH o bien se absorbieron sobre Dowex-1 X8 y se esterificaron. Las porfirinas esterificadas se determinaron allí cuali y cuantitativamente por HPLC según Seubert & Seubert (1982).

VI.3.1.4. UNIDAD ENZIMATICA

La unidad enzimática (UE) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de producto (en las condiciones standard de incubación) y la actividad específica, como el número de unidades enzimáticas por mg de proteína (UE/mg prot).

En el caso de la URO-D se define una unidad enzimática en base a los nmoles de productos formados (hepta + hexa + penta + coproporfirina) a partir de Urogen III, en 60 minutos.

VI.3.2. DETERMINACION DE PROTEINAS

Se realizó según el método de Lowry et al. (1951): a 0,4 ml de una dilución apropiada de la solución proteica (1/100 para hígado y riñón) se agregaron 2 ml de una mezcla compuesta por CO_3Na_2 2% en NaOH

0.1N, SO_4Cu . 5 H_2O .5% en tartrato de sodio y potasio 1% (20 ml : 0,4 ml) luego de 10 minutos a temperatura ambiente, se agregó 0,2 ml de reactivo de Folin diluido al medio con H_2O y se agitó inmediatamente.

Se realizó blanco de reactivo. Se leyeron las absorbancias a los 30 minutos en un espectrofotómetro Shimadzu - 21 OA.

Los mg de proteína se calcularon aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mg de proteínas/ml} = (L - B) \cdot d \cdot 0,5$$

Donde: L = absorbancia de la muestra, a 660 nm.

B = absorbancia del blanco a 660 nm.

d = factor de dilución.

0,5 = factor obtenido de la curva de calibración con albúmina
bovina

VI.3.3. DETERMINACION DE ALA Y PBG EN PLASMA

ALA y PBG en plasma se midieron de acuerdo a Mauzerall & Granick (1956) con algunas modificaciones: a 2 ml de plasma se añadieron 0,2 ml de TCA 50 % para precipitar la proteína.

El precipitado se eliminó por centrifugación 10 minutos a 1000 x g y en el sobrenadante se midieron ALA y PBG empleando la cromatografía de intercambio descripta por Mauzerall & Granick (1956) y la técnica colorimétrica de Moore & Labbe (1964).

VI.3.4. DETERMINACION DE PORFIRINAS EN PLASMA

El índice de porfirinas plasmático fue evaluado por análisis fluorométrico, de acuerdo a la metodología descrita por Schoua y Batlle (1987). A 0,3 ml de plasma se agregó 2,7 ml de $\text{NaPO}_4\text{H}_2 / \text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 0,01 M pH 7,4 conteniendo 0,9 % NaCl. El espectro de emisión de fluorescencia del plasma diluido a la longitud de onda de 400 nm se realizó en un espectrofluorómetro Shimadzu RF-150. Las longitudes de onda del espectro de emisión estuvieron dentro del rango 550 a 700 nm. El índice de porfirinas plasmático se definió como I_m/I_o , donde I_m : intensidad de fluorescencia máxima de emisión e I_o : línea de base a la longitud de onda de I_m .

Las porfirinas del plasma se separaron por absorción sobre talco inodoro. A 8 ml de plasma llevado a su punto isoeléctrico (pH 3 – 3,2) con ácido acético glacial, se le agregaron 1,5 g de talco, se agitó vigorosamente y la mezcla resultante se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos, el sobrenadante se descartó. El talco se lavó con 8 ml de solución fisiológica, se centrifugó nuevamente como el paso anterior y las porfirinas retenidas en el talco se eluyeron con la mezcla esterificante, $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{CH}_3\text{OH}$ (10 : 90; v/v), se dejaron en oscuridad a temperatura ambiente y al cabo de 24 hs se extrajeron con cloroformo.

Las porfirinas esterificadas se determinaron cuantitativamente por espectrofotometría con el método de Rimington (1960). Las porfirinas esterificadas en la fracción clorofórmica, fueron concentradas a sequedad en baño maría o con corriente de N₂. El patrón de porfirinas se determinó por cromatografía en capa delgada (TLC) (Kieselgel 60, Merck), empleando cromatofolios. A 1 de silicagel 60 Merck (sin indicador fluorescente) para cromatografía en capa fina (20 x 20 cm, espesor de capa 0,2 mm). La cromatografía se resolvió en dos corridas: la primera de 20 minutos, empleando como solvente de desarrollo: benceno : metil etil cetona (20:1,5; v:v) y la segunda durante 45 minutos, solvente de desarrollo: benceno: acetato de etilo: metanol: eter de petróleo (25:0,5:1:3; v:v:v:v). Las porfirinas se revelaron por su fluorescencia a la luz UV, empleando una lámpara Tungstram HgV 125 W o el equipo Chromato – Vue Cabinet Mod CC 61, se identificaron de acuerdo a sus R_f, y se cuantificaron comparando con patrones de porfirinas esterificadas conocidas.

VI.3.5. CALENTAMIENTO, TRATAMIENTO CON TRIPSINA Y TCA DEL PLASMA

* CALENTAMIENTO :El plasma HD se incubó en un tubo cerrado Kimax a 100 °C durante 20 min. Luego se centrifugó a 2000 x g

durante 15 min, el sobrenadante se empleó para determinar su capacidad inhibitoria sobre el ALA-D de GR.

* TRATAMIENTO CON TRIPSINA: 1,2 ml de plasma HD se ajustaron a pH 8,0 con bicarbonato de sodio 25%. Se trató luego con tripsina (0.04 mg por mg de proteína total) a 40 °C durante 22 h, y se empleó para determinar su capacidad inhibitoria sobre el ALA-D de GR.

* TRATAMIENTO CON TCA: El plasma de HD se trató con TCA hasta una concentración final del 5%. Luego se centrifugó a 2000 x g durante 20 min, el sobrenadante se ajustó a pH 6,8 y se empleó para determinar su capacidad inhibitoria sobre al ALA-D de GR.

VI.3.6. DETERMINACIÓN DE GLUTATION REDUCIDO Y OXIDADO

La concentración de glutatión reducido (GSH) y de glutatión oxidado (GSSG) se midió en glóbulos rojos y plasma por el método fluorométrico de Hissin y Hilf (1976).

Los glóbulos rojos diluídos (1:10, v/v) se homogeneizaron en una mezcla (4:15, v:v) de ácido fosfórico 25 %: buffer fosfato de sodio 100 mM pH 8 conteniendo EDTA 5 mM (BPE). Las proteínas se eliminaron por centrifugación a 12000 rpm durante 10 min en una centrífuga Sorvall

refrigerada. Se tomó una alícuota del sobrenadante obtenido y se realizaron diferentes tratamientos para determinar el GSH y GSSG.

Para los estudios en plasma, se partió de la muestra sin diluir, siguiendo los mismos pasos que para glóbulos rojos.

*** GSH**

Una alícuota del sobrenadante se diluyó 10 veces en BPE. Se tomaron 0,1 ml de esta dilución y se tamponaron por el agregado de 1,8 ml de BPE, a esta solución le agregaron 0,1 ml de ortoftaldehído en una concentración de 1 mg/ml de metanol (OPT).

*** GSSG**

Una alícuota del sobrenadante se diluyó 10 veces con una solución de N-etilmaleimida 40 mM en NaOH 0,1 N. Luego de 30 min. a temperatura ambiente, se tomaron 0,1 ml de dicha solución y se agregaron 1,8 ml de NaOH 0,1 N y 0,1 ml de OPT. Después de un período de reacción de 15 a 20 min. a temperatura ambiente, se midió la fluorescencia a 420 nm resultante de la excitación a 350 nm.

Con concentraciones de GSH y GSSG patrones se realizó una curva de calibración, que se utilizó para las determinaciones.

VI.3.7. DETERMINACION DE PORFIRINAS EN ORINA

Se realizó según el método de Seubert & Seubert (1982): 1 ml de orina se sembró sobre una resina aniónica Dowex 2 X 8 – 200 – 400 mesh empaquetada en una columna cromatográfica de 0.8 cm x 3 cm. Se lavó con 10 ml de H₂O destilada y las porfirinas retenidas en la columna se eluyeron con HCl 3N, recogiendo fracciones de 2 ml, hasta completa elución.

La lectura de las absorbancias se realizó en un espectrofotómetro Shimadzu UV - 21 0A.

Las porfirinas se cuantificaron con la siguiente expresión:

$$\mu\text{g Porf/ ml} = \{ 2 \cdot A_{\text{max}} - (A_{380} + A_{430}) \} \times V \times 5.95$$

Donde : A 380 = Absorbancia a 380 nm

A 430 = Absorbancia a 430 nm

A max = máximo de absorbancia entre 400 y 410 nm

V = Volumen total del eluido

5.95 = factor

VI.3.8. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR

La calibración de la columna se realizó mediante la siembra de proteínas de peso molecular (PM) conocido, las mismas fueron: Ribonucleasa A (PM:13700 Da), Ovoalbúmina (PM:45.000 Da) y Seroalbúmina Bovina (PM:134.000 Da). Se sembraron muestras de 1 ml en una concentración de 2 mg/ml.

El V_0 de la columna se determinó mediante el uso de Blue Dextran (PM $2 \cdot 10^6$ Da). El solvente de corrida utilizado fue buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 6,8. y con un flujo de 0,4 ml/min. Las corridas se realizaron a 4°C, se recogieron fracciones de 2 ml mediante el colector de fracciones Frac-300 Pharmacia. Se leyó la absorbancia característica del Blue Dextran a 615 nm en el espectrofotómetro Shimadzu double-beam UV-210 A. Los marcadores de PM se detectaron en los eluidos por su absorbancia a 260nm y 280nm. Con estos datos se calcularon los volúmenes de elución y se representó la relación V_e/V_0 en función del log del peso molecular (PM) (Figura VI.2).

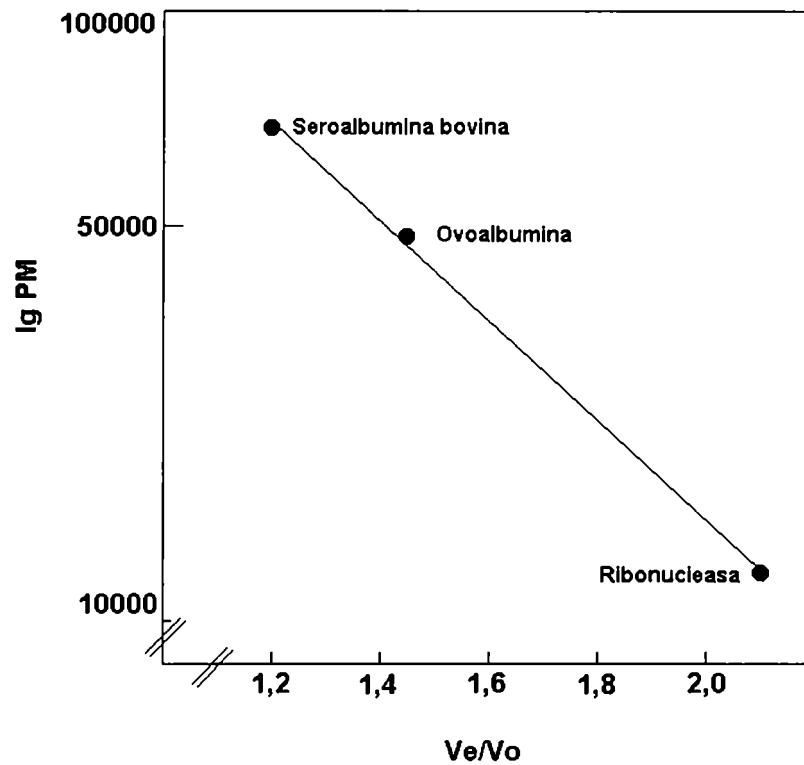


FIGURA VI.2.: Curva de calibración para determinación de pesos moleculares.

VI.4. MODELO EXPERIMENTAL DE PSEUDOPORFIRIA

Se reprodujo el modelo experimental de pseudoporfiria en hemodiálisis propuesto por Keane empleando ácido nalidixico (1984).

Para ello se utilizaron ratones hembras CF1 mantenidas con una dieta de Purina-3 y agua *ad libitum* a 20 °C. 24 ratones se dividieron en

cuatro grupos de 6 cada uno identificados como G I, G II, G III y G IV. Los pesos promedio fueron: G I = $32,5 \pm 4,08$ g, G II = $32,8 \pm 2,13$ g, G III: $34,81 \pm 3,19$ g y G IV: $34,76 \pm 3,28$ g. A los grupos G I y G III se les administró ácido nalidíxico i.p.(0,15 mg/g peso corporal) y a los del G II y G IV solución fisiológica intraperitonealmente durante 10 semanas. GI y GII fueron irradiados diariamente con luz UV (I: 5,6 Joules / seg) cada día durante 12 horas a una distancia de 37 cm, durante 2 períodos de 5 semanas. Entre cada período de iluminación hubo 2 semanas sin tratamiento.

En todos los casos se inyectó un volumen de solución no superior al 1% del peso corporal.

Para los estudios lumínicos se utilizó una lámpara U.V. Tungstram de 125 W HgV O 370 E27. Con el fin de determinar su intensidad óptima se midió la irradiancia de la lámpara a distintas distancias de las jaulas. Para ello se utilizó un radiómetro Yellow Springs Instruments. Los datos técnicos de la lámpara fueron suministrados gentilmente por el Ing. Allegue de Phillips Argentina S.A.

Para obtener la solución se disolvieron: 150 mg de ácido nalidíxico en NaOH 0,1M, pH: 7,4 y luego se llevó a un volumen final de 10 ml con solución fisiológica. Esta solución se preparó semanalmente y se conservó en oscuridad a 5°C.

Al finalizar el tratamiento lumínico, se colocaron a los ratones en jaulas metabólicas, durante 24 horas para la recolección de orina.

Los animales previamente heparinizados se sacrificaron por asfixia en cámara de éter.

Hígados y riñones se perfundieron con solución fisiológica (NaCl 0,9%) y finalmente se extrajeron los órganos; conservándolos a -20 °C hasta su estudio.

VI.5 AISLAMIENTO, PURIFICACION, ANALISIS Y SECUENCIA DE AMINOACIDOS DEL INHIBIDOR:

VI.5.1 PURIFICACION DEL INHIBIDOR

Se cromatografió 1,5 ml de plasma de pacientes hemodializados por Sephadex G-100 empaquetado en una columna de vidrio (175 cm de largo x 1,5 cm de ancho), equilibrada y eluída con buffer fosfato 50 mM, pH 6,8 y un flujo de 0,4 ml/min.

En el eluído se identificó la fracción inhibitoria por su absorción a 280 nm y por su capacidad inhibitoria del ALA-D.

VI.5.2. DETERMINACION DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DEL INHIBIDOR:

El estudio de inhibición del plasma purificado se llevó a cabo midiendo su efecto sobre la actividad del ALA-D parcialmente purificada de sangre humana (56,9 U/mg) o de hígado de cerdo (Actividad específica 37,8 U/mg).

Para el estudio del efecto inhibitorio del plasma sobre la actividad del ALA-D, se añadió 0,10; 0,25; 0,40 ó 0,5 ml de plasma al sistema de incubación que se detalla en VII.3.1.1. y se varió la cantidad de agua de manera que el volumen final fue 1,0 ml.

El porcentaje de inhibición (I%) se calculó:

$$\% I = 100 \% - \frac{\text{ALA-D GR N} - \text{PI HD}}{\text{ALA-D GR N}} \times 100$$

Siendo:

GRN	=	Glóbulos rojos normales
PI HD	=	Plasma hemodializado

VI.5.3. SDS-PAGE EN MINIGELES

Para el seguimiento de la purificación y establecer la homogeneidad de las fracciones purificadas se utilizó la electroforesis en gel por el método SDS-PAGE.

Para la purificación de las distintas fracciones provenientes de la cromatografía de los plasmas por Sephadex G-100 según VI.5.1., se realizaron SDS-PAGE en minigeles (Laemmli, 1970), utilizando la minicelda de electroforesis Mini - Protean II (Bio-Rad).

Este sistema electroforético discontinuo consiste de dos geles contiguos distintos entre sí: un gel de separación (resolución) situado abajo y otro concentrador "stacking" situado arriba. Ambos con diferentes porosidades, pH y fuerza iónica.

El gel de corrida contenía: 10 ml de Acrilamida 30%; 8,5 ml de agua; 4 ml de bisacrilamida 0,8 %; 7,5 ml de buffer Tris 1,5M (pH 8,8) ; persulfato de amonio (APS) (10%) 135 ml y 10 ml de N,N,N',N'- tetrametil-etilendiamina (TEMED).

Este gel se vertió entre las placas del minigel, dejando lugar para el gel de "stacking" y el peine. Luego de su colocación se agregó una pequeña cantidad de agua o butanol y se dejó polimerizar. Una vez

polimerizado el gel, se colocó el peine en el espacio correspondiente al gel de "stacking"; el peine permitió la creación de las distintas calles donde luego se sembró la muestra. Se vertió entonces el "stacking gel" sobre el primer gel, este gel contenía: 1ml de Acrilamida 30 %, 6 ml de agua , 0,4 ml de bisacrilamida 0,8 %, 2,5 ml de Tris 0,5 M (pH 6,8), 100 ml de APS; 100 ml de SDS (10%) y 10 ml de TEMED.

El buffer de corrida fue: Tris 25 mM, glicina 100 mM, SDS 0,1 % pH 8,3.; el buffer de las muestras contenía: Tris 80 mM, SDS 2%, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0,02 %. Las muestras se prepararon para la corrida adicionándoles buffer de muestra hasta el 20 %. Se utilizaron marcadores de PM que cubrieron el rango necesario.

Para realizar la corrida se colocó el gel en la cuba y se llenó la misma con buffer de corrida.

Se sembraron las muestras en las calles que se formaron mediante el uso del peine. Se preenfocó a 50 mV y se dejó correr a 150 mV hasta que el frente del colorante llegó al borde inferior.

VI.5.4. TINCION DE MINIGELES CON COOMASIE-BLUE.

La tinción de los geles desarrollados como se indica en VI.5.3. se realizó mediante el uso de una solución que contenía: metanol ac. acético: agua (5:2:1,v:v:v) incluyendo 0,05 % de Coomassie Blue.

Se dejó colorear el gel durante 30 min. a 50 °C. Luego se colocó al gel en una solución decolorante : metanol: ác. acético: agua (5:1:4; v:v:v).

VI.5.5. TINCION CON PLATA DE MINIGELES

Para la tinción argéntica de los SDS-PAGE realizados según VI.5.3. se utilizó el kit Bio-Rad Silver Stain, empleando la técnica modificada para minigeles.

En primer lugar se colocó a los geles en solución fijadora que contenía: 40% de metanol y 10% de ácido acético (v/v). Luego se sumergió al gel completamente en reactivo oxidante (dicromato de potasio ; ácido nítrico) durante 5 minutos.

Posteriormente se realizaron 6 a 7 lavados del gel con agua durante aproximadamente 15 minutos para eliminar el oxidante remanente y se colocó entonces al gel en reactivo de plata (solución de nitrato de plata) durante 20 minutos.

Luego de un corto lavado del gel, se lo expuso al reactivo desarrollador (solución de para-formaldehído en carbonato de sodio) hasta que un precipitado negro apareció en solución y se obtuvo la

coloración deseada de las bandas, deteniendo la reacción con el agregado de ácido acético 5% durante 15 minutos.

VI.5.6. SDS-PAGE PARA EL AISLAMIENTO DEL INHIBIDOR:

Estos geles se prepararon con un tamaño de calle mayor que los geles anteriores. Se sembraron tres calles con inhibidor proveniente del pool de Sephadex G-100 y en las calles a los costados de la muestra marcadores de peso molecular.

Luego de realizar la corrida electroforética se procedió a cortar el gel en dos partes, una de ellas contenía una calle lateral con marcadores y 25 % de una calle con muestra, la otra contenía el resto del gel. La primera se coloreó con Coomassie Blue, el resto del gel se dejó sin colorear en un medio húmedo, a 5 °C., en oscuridad. Luego de la coloración e identificación la banda protéica de interés, ésta se ubicó en el gel sin colorear, por superposición con el gel coloreado.

Se procedió entonces a cortar del gel sin colorear la zona donde se encontraba la banda del inhibidor (40 mg) para llegar a su posterior electroelución.

VI.5.7. ELECTROELUCION DE LA BANDA PROTEICA DEL INHIBIDOR

Para realizar la electroelución se utilizó el Electroeluter modelo 422 de Bio-Rad que permitió la recuperación del inhibidor de la banda cortada del gel según VI.5.6 (Figura IV.3).

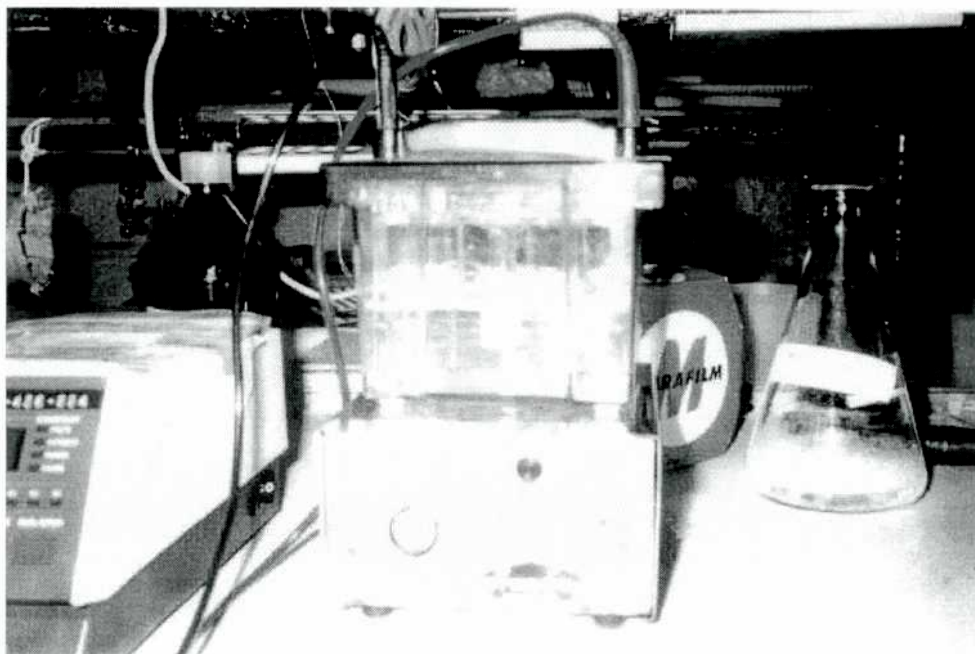


FIGURA VI.3. : Equipo para realizar electroelucion de proteínas.

Este aparato posee tubos de vidrio verticales donde se colocan los trozos de gel y buffer de elución (Figura VI.4).

El buffer de elución tenía la siguiente composición: bicarbonato de amonio 50 mM y SDS 0.1%. Luego de llenarse el tubo de vidrio con buffer de elución (BE), se colocaron los fragmentos de gel en la base hasta una

altura de 1 cm. Se armó el módulo completo en la cámara de buffer y se llenó con BE al igual que la cámara superior.

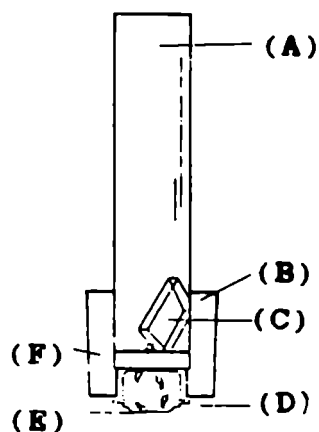


FIGURA VI.4. : Corte transversal del tubo; A: tubo de vidrio; B: adaptador de silicona; C: trozos de gel; D: capsula de membrana; E: membrana de diálisis; F: frit.

Debido a que el electrodo negativo se ubicó en la parte superior y el positivo en la inferior, se permitió el pasaje de las macromoléculas de los trozos de gel al "frit" y a la capsula de la membrana. Esto se debe a que las membranas de diálisis de este aparato poseen el tamaño de poro adecuado para la retención de la proteína de interés.

La elución se realizó con 8 - 10 mA/ tubo de vidrio, a corriente constante durante 14 hs. Luego del tiempo requerido, se sacó el adaptador de silicona junto con la tapa de membrana, de la base de los tubos, donde se encontró la proteína electroeluída. Se recogió el líquido de la tapa de la

membrana y se colocó en un tubo Eppendorf. A continuación se lavaron las membranas con 200 μ l de buffer de elución que se adicionaron al líquido recogido en el tubo Eppendorf.

El inhibidor electroeluido se liofilizó con el buffer volátil en un Speedvac Savant.

VI.5.8. ELECTROTRANSFERENCIA DE LA PROTEINA A POLIVINILDIFLUORURO (PVDF)

Se realizó la electrotransferencia de la banda proteica del gel realizado según VI.5.3., a una membrana de Inmovilón P (PVDF).

Para ello, se activó la hoja de PVDF por inmersión en metanol y, a continuación, se lavó con agua. Luego, se colocó la membrana en el buffer de electrotransferencia: ácido 3-ciclohexilamino-propano-sulfónico (CAPS) 10 mM en metanol 10%, pH: 11.

En este mismo buffer se colocaron también 6 trozos de papel Whatman #4 del tamaño del gel a transferir y esponjas pertenecientes al equipo de electrotransferencia.

Se cortó la porción del gel que contenía al inhibidor a transferir, y se colocó en buffer CAPS para eliminar los restos del buffer de electrotransferencia.

Se armó el equipo de transferencia como muestra la Fig.VI.5. Se conectó el aparato de electrotransferencia con el ánodo (+) del lado de la membrana de PVDF. Se dejó transferir a 100 mA durante 30 minutos.

Luego, se tomó la membrana de PVDF del aparato de transferencia y se lavó por inmersión en agua desionizada. El gel se colocó en una solución de Coomassie blue 0.1% como control de transferencia.

A continuación se coloreó la membrana con Coomassie blue 0.1 % en metanol y se decoloró con una solución de metanol: ác. acético: agua (5:1:4)(v:v:v).

Luego se lavó la membrana por inmersión en agua desionizada y se secó al aire. Una vez seca, se cortó la banda de interés, con un bisturí, para el análisis de aminoácidos y secuencia de aminoácidos (Matsudaira et al, 1992).

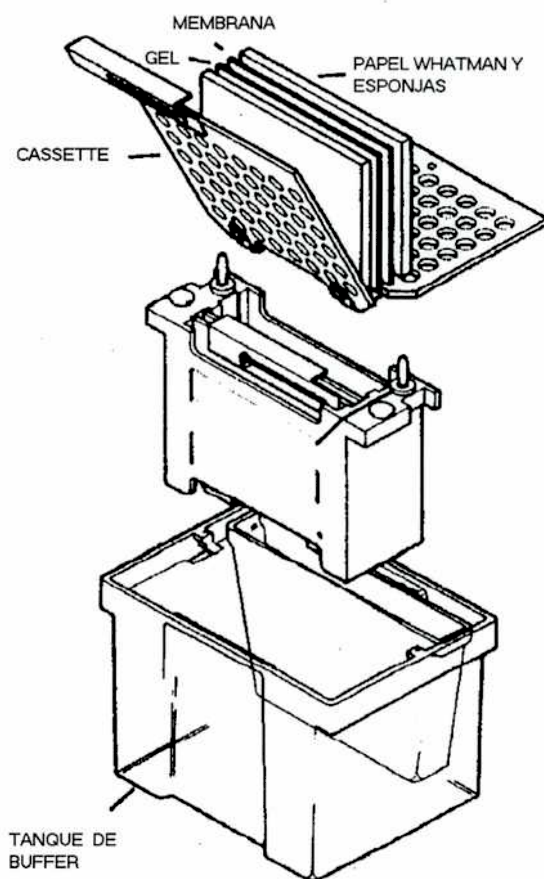


Figura VI.5.: Equipo de electrotransferencia

VI.5.9. ANALISIS DE AMINOACIDOS

El estudio de los aminoácidos presentes en la proteína se realizó en un analizador automático de aminoácidos modelo 420 A de Applied Biosystems.

VI.5.10. SECUENCIACION DEL INHIBIDOR

El análisis de las secuencias aminoacídicas internas, se llevó a cabo en un secuenciador de proteínas en fase gaseosa Applied Biosystems modelo 477 A, de acuerdo al programa standard suministrado por el fabricante. Los feniltiohidantoin-aminos (PTH)-aa. se separaron en un HPLC Applied Biosystems 120 A y se identificaron por su tiempo de retención.

VI.5.11. CLIVAJE CON BrCN DEL INHIBIDOR INMOVILIZADO EN PVDF

Se realizó el clivaje del inhibidor inmovilizado en una membrana de PVDF de acuerdo a VI.5.8., mediante una hidrólisis con bromuro de cianógeno.

Se cortó la banda del inhibidor de la membrana utilizando un bisturí y se colocó en un tubo Eppendorf. A continuación se agregó al tubo bromuro de cianógeno 0,15M en ácido fórmico 70%.

El tubo se mantuvo en oscuridad durante 17 hs a temperatura ambiente. Se evaporó la muestra en un Speedvac Savant. Luego de realizar 2 lavados con 50 µl de agua, se evaporó nuevamente la muestra

en el Speedvac. Los péptidos obtenidos, se sometieron al análisis de secuenciación.

VI.5.12. DESBLOQUEO DEL N-TERMINAL DEL INHIBIDOR INMOVILIZADO EN PVDF

Se realizó el primer paso de la estrategia propuesta por Hirano et al. (1993) para desbloquear proteínas que tienen el N-terminal bloqueado (Figura VI.6).

En cada paso del esquema se intenta de desbloquear la proteína utilizando diferentes reactivos químicos para luego proceder al análisis secuencial a partir de su N-terminal. En el primer paso, se trata la proteína con ácido trifluoracético. El ácido trifluoracético sólo es efectivo si el N-terminal es treonina o serina bloqueados por acetilación. El grupo acetilo es el más común de los bloqueantes de proteínas.

El procedimiento consiste entonces, en tratar a la membrana de PVDF con distintos reactivos químicos, con el fin de desbloquearla. En primer lugar, se realizó un SDS-PAGE de la proteína. Luego se inmovilizó en PVDF.

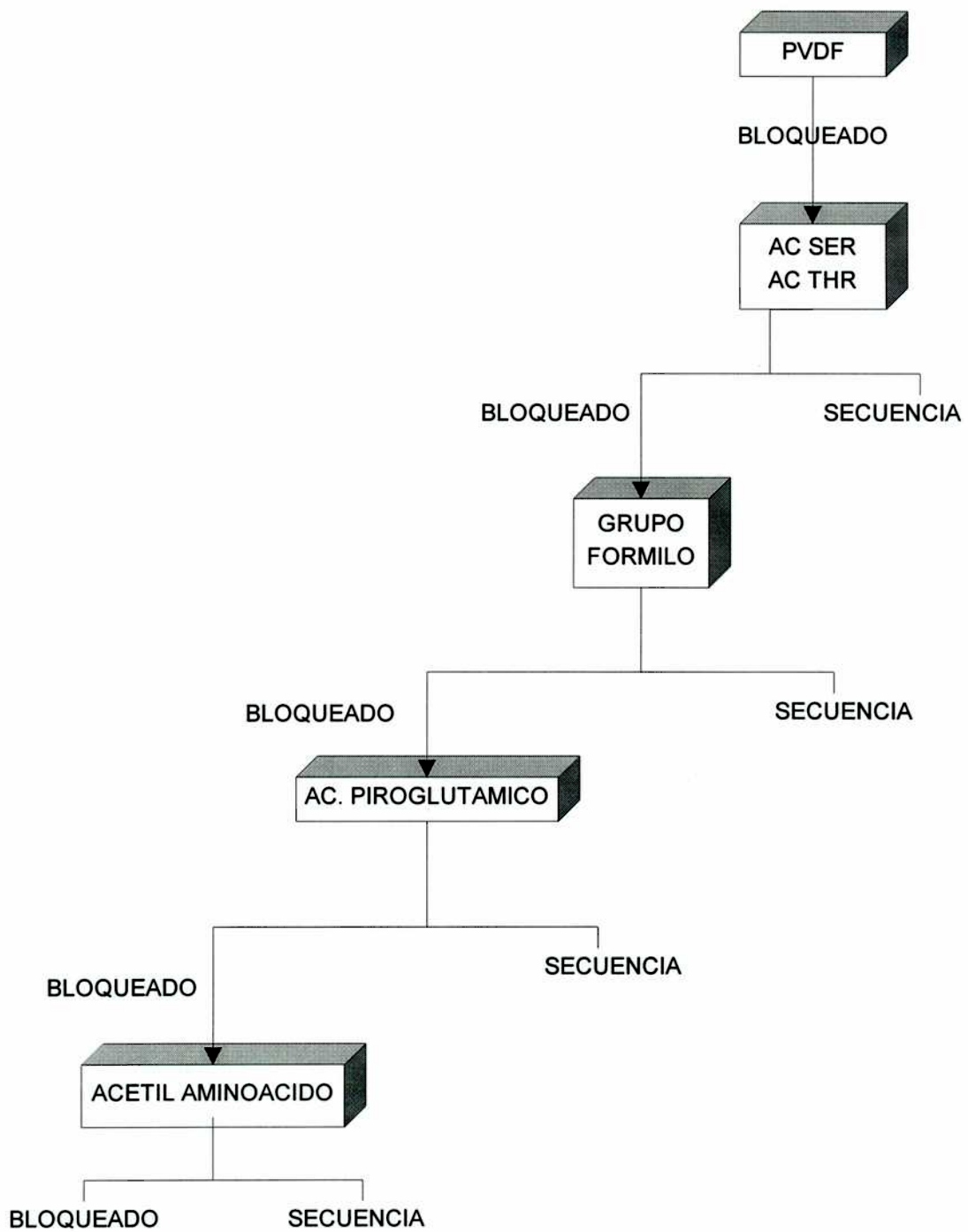


Figura VI. 6.: Esquema para el desbloqueo de proteínas con el N-terminal bloqueado.

La banda proteica se cortó de la membrana y se trató con ácido trifluoroacético a 60 °C durante 30 minutos. Luego de este tratamiento, la muestra estuvo lista para el análisis secuencial.

VI.5.13. AISLAMIENTO QUIMICO DE UNA SECUENCIA UNICA DESDE UNA MEZCLA DE POLIPEPTIDOS

En 1992, Wadsworth et al. describieron un método simple y sensible para obtener la secuencia N-terminal y otras secuencias internas de muestras proteicas inmovilizadas en PVDF. Según este método una mezcla de péptidos (provenientes de un tratamiento con bromuro de cianógeno) se trata con OPA (orto-ftaldehído). Este reactivo reacciona con todos los N-terminales excepto cuando existe una prolina terminal. Esto permite separar una secuencia del resto cuando se encuentre una prolina en el N-terminal de un péptido. Esta reacción con OPA se lleva a cabo en el secuenciador. y se realiza en muestras con gran cantidad de péptidos.

VI.5.14. AISLAMIENTO DE PEPTIDOS PARA MICROSECUENCIACION POR DIGESTION PROTEOLITICA EN SDS-PAGE

El SDS-PAGE y la electroforesis bidimensional son considerados como el último paso (o el único) de purificación. Sin embargo, en muchos

casos la secuenciación directa no es posible. Es por ello que para el inhibidor de la enzima ALA-D se diseñó una estrategia como la descrita por Rosenfeld (1992) para obtener fragmentos peptídicos. La fracción inhibitoria del ALA-D proveniente del Sephadex G-100 se incubó con buffer muestra (Buffer Tris-HCl 0,06 M pH: 6,8; SDS 2%; glicerol 10% y azul de bromofenol 0,025%) durante 4 minutos a 96 °C.

A continuación se incubó con 4-vinilpiridina a temperatura ambiente durante media hora y se realizó con este material una electroforesis como se indica en VI.5.3. Posteriormente el gel se tiñó con Coomasie blue 0.2 % con 20 % de metanol y 0.5 % de ácido acético durante 20 minutos.

La decoloración se realizó con metanol 30 %. La banda de interés se extrajo del gel y se lavó con 150 ml de acetonitrilo 50% que contenía carbonato de amonio 200 mM (pH 8,9) durante 20 minutos a 30 °C. Se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se le añadió carbonato de amonio 200 mM (pH 8,9) Tween-20 0.02%.

Se agregó 2 ml de una solución de tripsina (0,25 mg/ml en carbonato de amonio 200 mM, pH 8,9). Se añadió buffer suficiente y se incubó 4 horas a 30 °C.

La digestión finalizó con el agregado de 1,5 ml de ácido trifluoracético.

La extracción se realizó con 200 ml de acetonitrilo 60%, con 0,1 % de ácido trifluoracético, durante 20 minutos a 30 °C y con agitación constante. El extracto se recogió en un Eppendorf y se concentró a 20 ml en un Speedvac.

Los péptidos se separaron en un HPLC empleando una columna C₁₈ "narrow-bore" y se monitoreó a las siguientes longitudes de onda : 215 nm, 254 nm (cisteínas piridiletaladas) y 278nm (residuos aromáticos) (Rosenfeld,1992).

VI.6. ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el test t- student. utilizando el programa Sigma Plot version 2.0 (PC version).

VI.7. BIBLIOGRAFIA

AFONSO, S.G.; CHINARRO FAMILIAR, S.; STELLA, A. M.; BATLLE, A. M.del C.; LENCZNER, M. & MAGNIN, P. H.: Uroporfirinógeno decarboxilasa eritrocitaria y hepática en porfiria cutánea tardía. Rev. Arg. Derm., 66, 12-24, 1985.

BATLLE, A.; FERRAMOLA, A. & GRINSTEIN, M.: Purification and general properties of delta aminolaevulinic acid dehydratase from cow liver. Biochem.J., 104, 244-249, 1967.

BATLLE, A.M. del C.; WIDER, E & STELLA, A.: A simple method for measuring erythrocyte porphobilinogenase, and its use in the diagnosis of acute intermittent porphyria, Int. J. Biochem., 9, 871-876, 1978.

BUSTOS, N.; STELLA, A.M. del C.; WIDER DE XIFRA, E. & BATLLE A: Studies on erythrocyte aminolevulinic acid dehydratase I. Its purification and possible therapeutic applications, Int. J. Biochem., 12, 745-749, 1980.

FUKUDA, H.: Acerca de la actividad del ALA-D en relación con su estructura molecular y el contenido de iones metálicos. Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires, 1988.

HIRANO, H.; KOMATSU, S.; KAJIWARA, H.; TAKAGI, Y. & TSUNAWA, S.: Microsequence analysis of the N-terminally blocked proteins immobilized on

polyvinylidenedifluoride membrane by western blotting, *Electrophoresis*, 14, 839-846, 1993.

HISSIN, P. & HILFF, R.: A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutation in tissues, *Anal. Biochem.*, 74, 214-226, 1976.

KEANE, L.; PEARSON, D. & MALIKSON, K.: Nalidixic acid-induced photosensitivity in mice: a model for pseudoporphyria., *Inv. Derm.*, 82, 210-215, 1984.

LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-687, 1970.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A. & RANDALL, R.: Protein measurement with Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-232, 1951.

MAUZERALL, D & GRANICK, S.: The occurrence and determination of δ -aminolaevulinic acid and porphobilinogen in urine, *J. Biol. Chem.*, 219, 435-446, 1956.

MOORE, D. & LABBE, R. A, Quantitative assay for urinary porphobilinogen, *Clin. Chem.*, 10, 1105-1110, 1964.

RIMINGTON, C. Spectral-absorption coefficients of some porphyrins in the Soret-band region. *Biochem J* 75, 620 - 624, 1960.

ROSENFELD, J.; CAPDEVILLE, J.; GUILLEMONT, J.C. & FERRARA, P.: In gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.*, 203, 173-179, 1992.

SCHOUA, A. E. M. Y BATLLE, A.M. DEL C. Índice de porfirinas plasmáticas: IPP. Un método rápido para la caracterización de las porfirinas. *Rev. Arg. Derm.* 68, 79-85, 1987.

SEUBERT, A. & SEUBERT, S. High-performance liquid chromatographic analysis of porphyrins and their isomers with radical compression columns. *Anal Biochem* 124, 303 - 307, 1982.

TOMOKUNI, K.: Different behaviors of erythrocyte 5-aminolevulinic acid dehydratase. *Archs. Environ. Hlth.*, 30, 148-152, 1975.

WADSWORTH, C.; KNUTS, M.; BURRUS, L.; OLWIN, B. & NICE, R.: Reusing PVDF Electroblotted protein samples after N-terminal sequencing to obtain unique internal amino acid sequence, en Hugli, T.E. Ed. *Techniques in Protein Chemistry*, 61-68, Academic Press, San Diego, California, USA, 1992.

RESULTADOS

CAPITULO VII

MODELO EXPERIMENTAL DE PSEUDOPORFIRIA

	Página
VII.1. Introducción.....	196
VII.2. Porphirinas urinarias.....	198
VII.3. ALA-D entrocitaria.....	199
VII.4. ALA-D en riñón.....	200
VII.5. ALA-D en hígado.....	201
VII.6. Conclusiones.....	204

VII. MODELO EXPERIMENTAL DE PSEUDOPORFIRIA

VII.1. INTRODUCCION

Se ha empleado como modelo experimental para la pseudoporfiria del hemodializado el que resulta de la acción fototóxica producida por el ácido nalidíxico administrado a animales.

El espectro de absorción del ácido nalidíxico (Figura VII.1) mostró un máximo de a 318 nm.

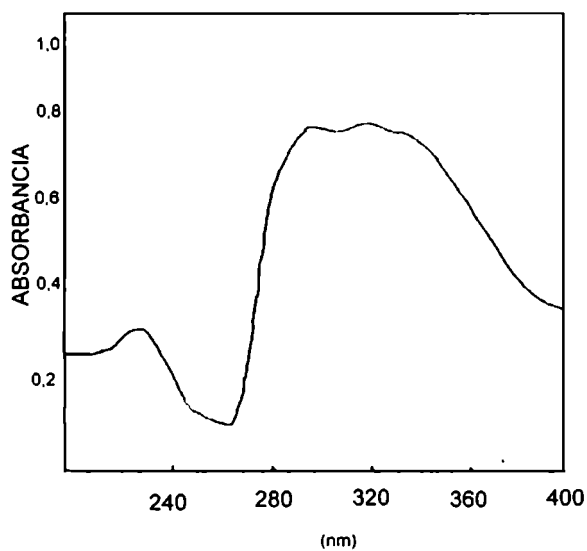


FIGURA VII.1: Espectro de absorcion del acido nalidixico

La lámpara U.V. tipo HPW 125 W fue la fuente de radiación de energía ultravioleta. El espectro de emisión de energía relativo de la lámpara entre las longitudes de onda = 300 - 400 nm., se muestra en la Figura VII.2 y aporta 8 % de la irradiancia total emitida. Se calculó entonces que el ácido nalidíxico absorbe 0,5058 Watts.

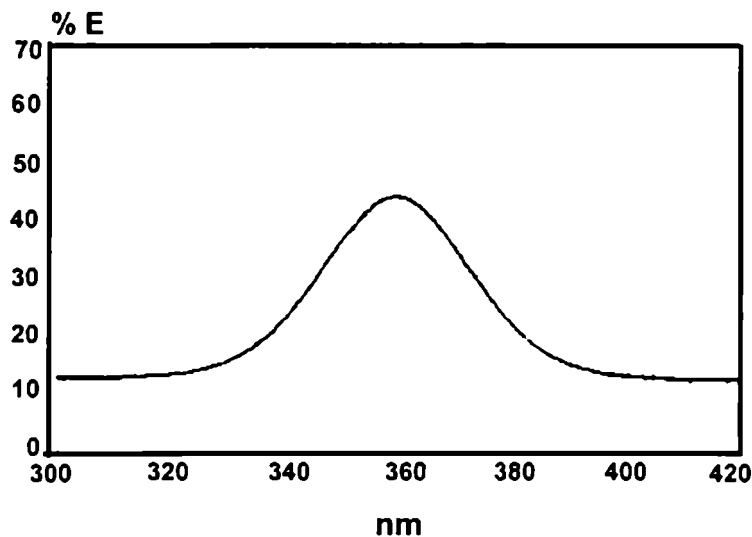


FIGURA VII.2.: Espectro de emision de la lampara UV

La distancia desde el bulbo hasta el radiómetro fue de 37,5 cm. La irradiación en estas condiciones fue de $5,6 \text{ J/cm}^2$ (Figura VII.3).

Los distintos grupos de animales se trataron con y sin ácido nalidíxico y se irradiaron según se indicó en Materiales y Métodos. Luego se realizaron las determinaciones bioquímicas en orina, sangre, hígado y riñón, cuyos resultados fueron los siguientes:



FIGURA VII.3.: Irradiación de las jaulas de ratones con la lampara UV.

VII.2. PORFIRINAS URINARIAS:

El contenido de porfirinas urinarias en los grupos G I, G II , G III y GIV, se encontró dentro de los valores controles del grupo G IV que fueron de $0,355 \pm 0,057 \mu\text{g/ml}$ orina.

VII.3. ALA-D ERITROCITARIA

La Figura VII.4. muestra la variación de la actividad del ALA-D en los distintos grupos de ratones.

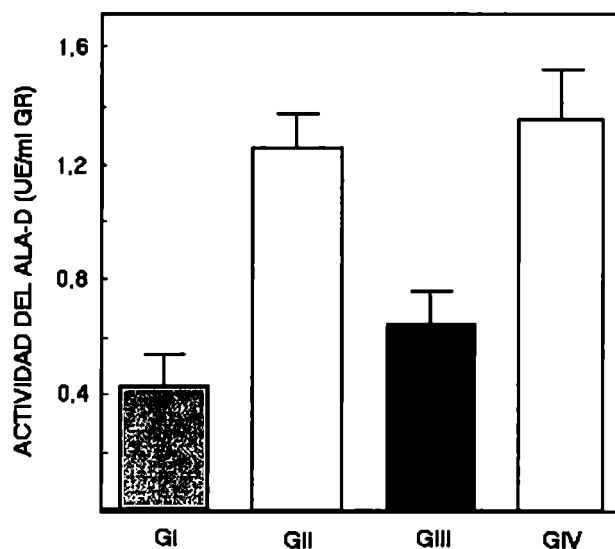


FIGURA VII.4. Actividad del ALA-D eritrocitaria en el modelo experimental de pseudoporfiria. Grupos de animales tratados con : GI (▨), ácido nalidixico + luz; GII (), solución fisiológica + luz; GIII (■), ácido nalidixico y GIV (□), solución fisiológica. Los detalles experimentales están indicados en Materiales y Métodos

El G I, que recibió ácido nalidixico y fue irradiado con luz U.V. , mostró una disminución del 68 % en la actividad del ALA-D = $0,434 \pm 0,156$ U/ml de GR con respecto al control G IV que fue de $1,347 \pm 0,243$ U/ml GR.

La sola administración de ácido nalidíxico, grupo GIII también modificó significativamente ($p < 0,001$) la actividad del ALA-D que resultó ser de $0,659 \pm 0,259$ U/ml GR, lo cual representa una disminución del 50 % respecto de los controles.

Por último la sola radiación U.V., grupo GII, no produjo cambio significativo en la actividad del ALA-D que fue de $1,275 \pm 0,215$ U/ml GR, apenas una disminución del 5 % respecto del grupo control.

De estos resultados surge que el ácido nalidíxico provoca una disminución de la actividad del ALA-D eritrocitaria que se incrementa con el tratamiento lumínico, lo cual también indica que reproduce las alteraciones que se observan en el paciente hemodializado, en cuanto a este parámetro bioquímico.

VII.4. ALA-D EN RIÑÓN

La Figura VII. 5. muestra la actividad del ALA-D de riñón en los distintos grupos de ratones tratados con ácido nalidíxico, con/sin luz U.V. y controles sin tratamiento alguno. El ácido nalidíxico y la radiación con luz U.V., grupo G I, produjo una disminución del 35% ($p < 0,05$) en la actividad del ALA-D = $1,004 \pm 0,143$ U/mg, respecto de la actividad de los

controles G IV= $1,537 \pm 0,247$ U/mg.

El ácido nalidíxico solo (G III) disminuyó un 20 % la actividad de la enzima que fue de $1,269 \pm 0,158$ U/mg prot. ($p < 0.05$).

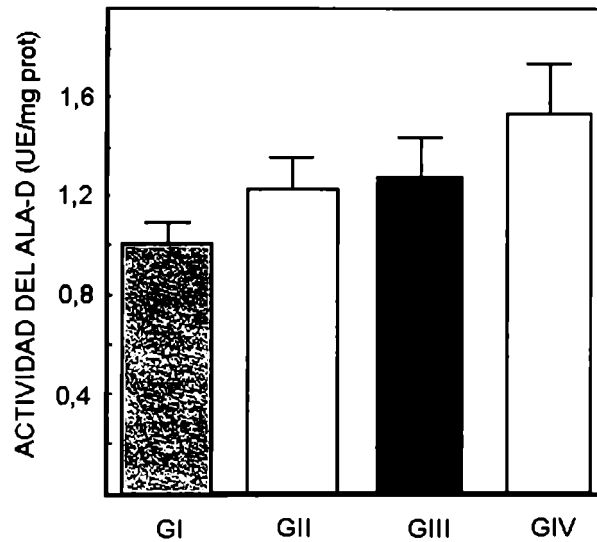


FIGURA VII.5 : Actividad del ALA-D de riñón en el modelo de pseudoporfiria.

Los grupos de animales y simbolismo son los mismos que los indicados en la leyenda de la FIGURA VII.4.

VII. 5. ACTIVIDAD DEL ALA-D EN HIGADO

La Figura VII. 6. muestra la variación de la actividad del ALA-D hepática en los distintos grupos de animales.

El grupo G I, tratado con ácido nalidíxico y luz U.V. mostró una disminución del 46% ($p < 0.05$) en la actividad de la enzima, que fue del

2.137 ± 0.319 U/mg prot. con respecto a la del grupo control G IV = $3,97 \pm 0,345$ U/mg de prot.

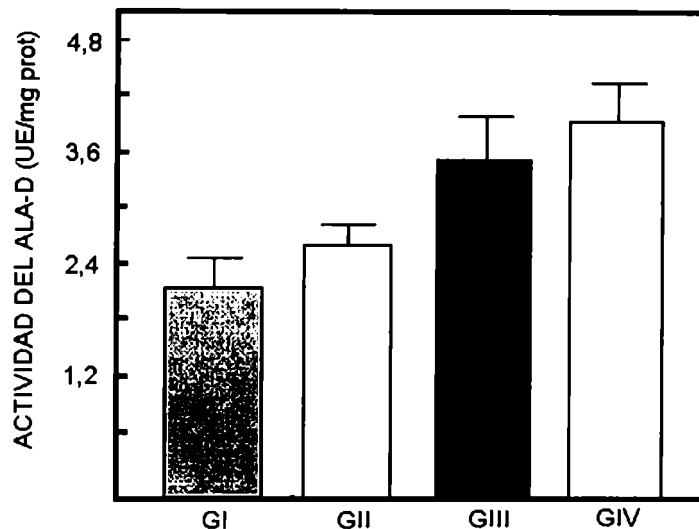


FIGURA VII. 6. Actividad del ALA-D hepática en el modelo experimental de pseudoporfiria. los grupos de animales y su simbolismo son los mismos que los indicados en la leyenda de la FIGURA VII.4 .

Una vez más fue interesante encontrar en el grupo G II, que recibió solamente tratamiento lumínico, una disminución del 25 % de la actividad de ALA-D = $2,625 \pm 0,418$ U/mg prot. ($p < 0.05$), siempre respecto del grupo control G IV. La actividad de ALA-D del grupo G III = $3,565 \pm 0,149$ U/mg prot., que recibió únicamente ácido nalidíxico, fue un 10% menor ($p < 0.05$) respecto del control.

Estos resultados muestran que en hígado de ratones tratados con

ácido nalidíxico o luz U.V. ocurre una disminución en la actividad del ALA-D, que es mucho mayor cuando reciben el tratamiento combinado con la droga y luz.

En la Tabla VII.1., se resumen los resultados obtenidos para el ALA-D de los 3 tejidos, en los animales que recibieron el ácido nalidíxico o luz solamente y su combinación, si bien la droga inhibió la actividad de la enzima en todos los casos, su mayor efecto se observó en sangre, en tanto que la irradiación, redujo entre un 20-25 % la actividad en riñón e hígado.

TABLA V: ALA-D en sangre, riñón e hígado de ratones tratados con ácido nalidíxico, luz U.V. y ácido nalidíxico + luz UV.

	ALA-D (%)		
	AC. NALIDIXICO	LUZ UV	AC. NALIDIXICO + LUZ UV
SANGRE	49	95	32
RIÑON	83	79	65
HIGADO	90	75	54

La actividad del ALA-D control, tomada como 100 % correspondió para GR = $1,347 \pm 0,243$ U/ml; Riñón = $1,537 \pm 0,247$ U/mg; Hígado = $3,970 \pm 0,345$ U/mg. Las condiciones experimentales se describen en Materiales y Métodos.

VII. 6. CONCLUSIONES

El contenido de porfirinas urinarias en los animales intoxicados con el fotosensibilizador fue normal.

El ácido nalidíxico produjo una disminución de la actividad del ALA-D mayor en sangre que en riñón e hígado.

El tratamiento lumínico afecta solamente la actividad del ALA-D en riñón e hígado.

La combinación del ácido nalidíxico y luz suma los efectos de ambos tratamientos, siendo el efecto más sensible en sangre que en hígado y riñón, vemos que la inhibición fue cerca del 70 % en sangre y dentro del orden del 35-45 % en hígado y riñón.

Los datos obtenidos, a nivel del comportamiento de la enzima ALA-D, están indicando que la administración de ácido nalidíxico, sólo o en combinación con la irradiación con luz U.V., producen un buen modelo animal experimental de pseudoporfiria.

CAPITULO VIII

ALTERACION EN EL METABOLISMO DEL HEMO EN PACIENTES HEMODIALIZADOS

	Página
VIII.1. ALA y PBG en plasma	205
VIII.2. Actividades de ALA-D y Deaminasa en sangre	207
VIII.3. Actividad de URO-D en sangre	208
VIII.4. Efecto de los iones zinc y el calentamiento	208
VIII.5. Zinc en plasma	213
VIII.6. Discusión y conclusiones	214
VIII.7. Bibliografía.....	216

VIII. 1. ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DEL HEMO EN PACIENTES HEMODIALIZADOS

VIII.1. ALA y PBG EN PLASMA

Las concentraciones de ALA y PBG en plasma en pacientes HD fueron 7,5 y 1,5 mayores que los valores controles ($p < 0,001$) respectivamente, antes de la diálisis (Figura VIII.1).

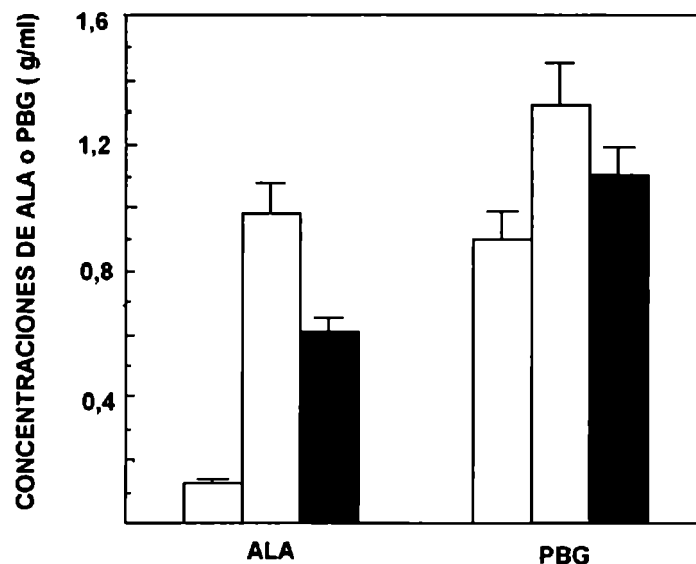


Figura VIII 1: ALA y PBG en plasma de individuos normales (□) y pacientes HD, antes (□) y después (■) de la hemodiálisis. Los datos representan los valores medios \pm DS, $p < 0,001$ del control. Los datos fueron : ALA: control = $0,13 \pm 0,02$ $\mu\text{g/ml}$; antes de diálisis = $0,98 \pm 0,09$ $\mu\text{g/ml}$, después de diálisis = $0,61 \pm 0,05$ $\mu\text{g/ml}$ - PBG : control = $0,90 \pm 0,09$ $\mu\text{g/ml}$; antes de diálisis = $1,32 \pm 1,3$ $\mu\text{g/ml}$, después de diálisis = $1,10 \pm 0,16$ $\mu\text{g/ml}$.

Después de la diálisis el ALA se redujo a valores 4,5 veces más altos que los controles en tanto que el PBG prácticamente se normalizó.

El IPP medio de los pacientes HD estuvo dentro de los valores normales (Figura VIII.2), con una emisión a 616 nm, indicando que las porfirinas plasmáticas en estos pacientes eran normales.

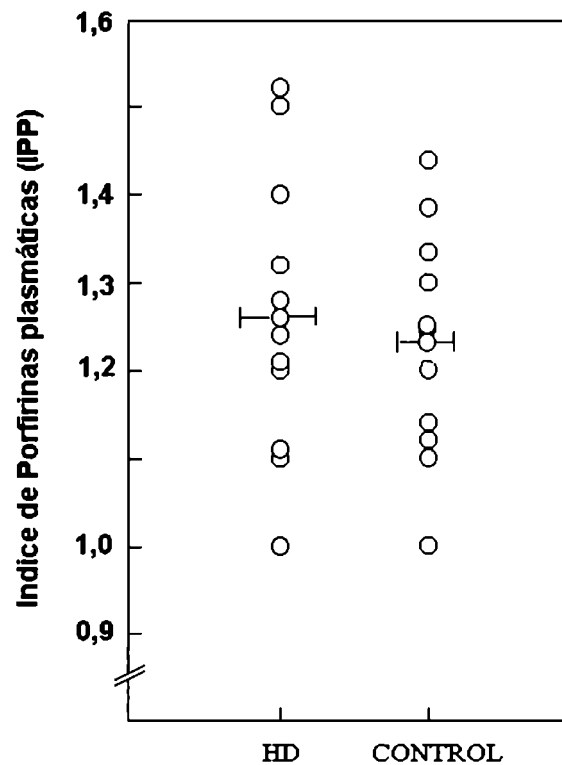


FIGURA VIII. 2.: Índice de porfirinas plasmáticas. El IPP de los pacientes hemodializados se determinó antes de la diálisis. Concentración de porfirinas en plasma, en $\mu\text{g/ml}$ – Controles = $0,049 \pm 0,010$, pacientes HD = $0,052 \pm 0,012$.

VIII.2. ACTIVIDADES DE ALA-D y DEAMINASA EN SANGRE

Las actividades de ALA-D y Deaminasa, estaban disminuídas en los pacientes HD (Figura VIII. 3.).

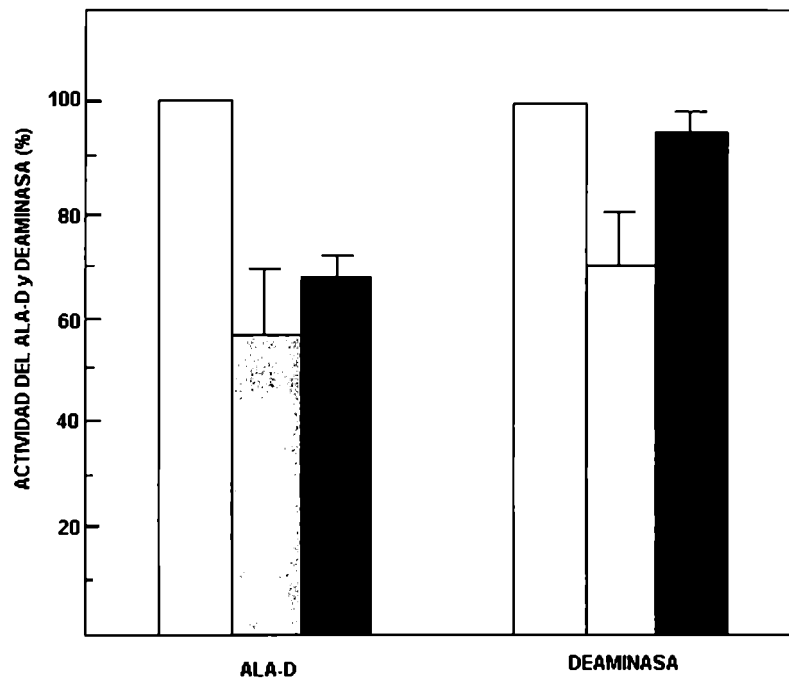


FIGURA VIII 3: ALA-D y Deaminasa en eritrocitos de controles (□) y pacientes HD, antes (□) y después (■) de la hemodiálisis. Los datos se expresan como porcentaje \pm DS de las actividades de los controles tomados como 100 % ($p < 0,001$). Los valores medios \pm DS en U/ml GR fueron: ALA-D control = $0,975 \pm 0,115$, antes hemodiálisis = $0,550 \pm 0,095$; después hemodiálisis = $0,666 \pm 0,100$ – Deaminasa: control = $77,32 \pm 10$; antes hemodiálisis = $54,13 \pm 9,13$, después hemodialisis = $73,45 \pm 9,46$.

La actividad del ALA-D se encontró reducida hasta el 60 % del control ($p < 0,001$) en los pacientes HD antes de la hemodiálisis y se recuperó entre un 10 y 20 % después de la hemodiálisis, aunque todavía se mantuvo por debajo de los niveles normales.

Si bien la Deaminasa se encontraba reducida cerca de un 30 % ($p < 0,001$) antes de la diálisis, luego de ella se recuperó los niveles controles.

VIII.3. ACTIVIDAD DE URO-D EN SANGRE

En los pacientes HD la actividad de la URO-D estuvo dentro de los valores normales en muestras tomadas antes o después de la hemodiálisis.

En la Figura VIII.4. se muestran los valores de las determinaciones antes de la hemodiálisis.

VIII.4. EFECTO DE LOS IONES ZINC y EL CALENTAMIENTO

Se sabe que tanto el agregado de zinc, como el calentamiento revierten la inhibición del ALA-D eritrocitaria por plomo (Tomokuni, 1975; Sakai et al, 1980).

Se investigó entonces si estos tratamientos también podrían reactivar la enzima de pacientes HD.

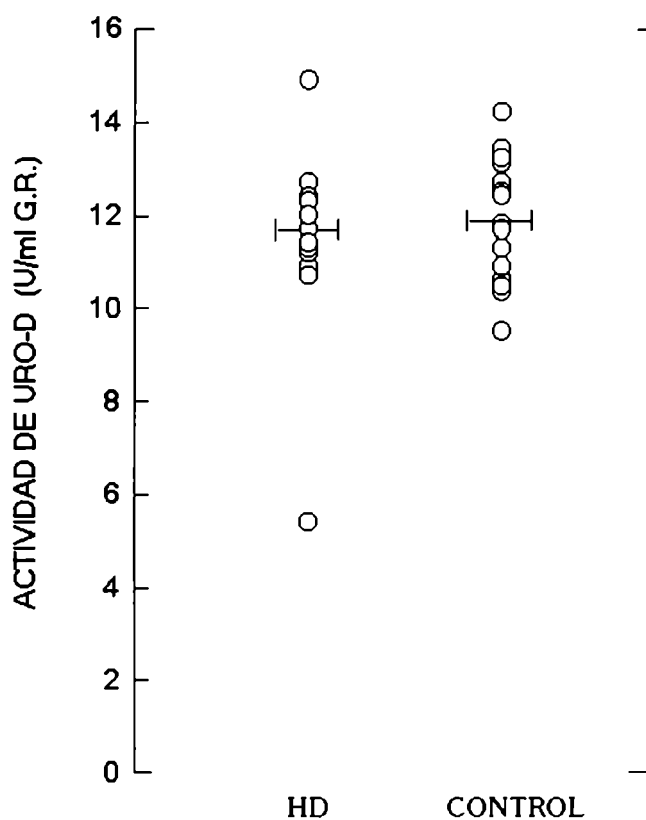


FIGURA VIII.4. : Actividad de URO-D eritrocitaria. Valores promedio de los pacientes HD = 11,45 \pm 1, 0 U/ ml GR, Controles = 12,50 \pm 1, 0 U/ ml GR.

En la Figura VIII.5. se muestra el efecto del agregado de cantidades crecientes de Zn^{2+} sobre la actividad del ALA-D en pacientes HD antes de la hemodiálisis. La máxima actividad del ALA-D se obtuvo en presencia de 22,5 Mm de Zn^{2+} .

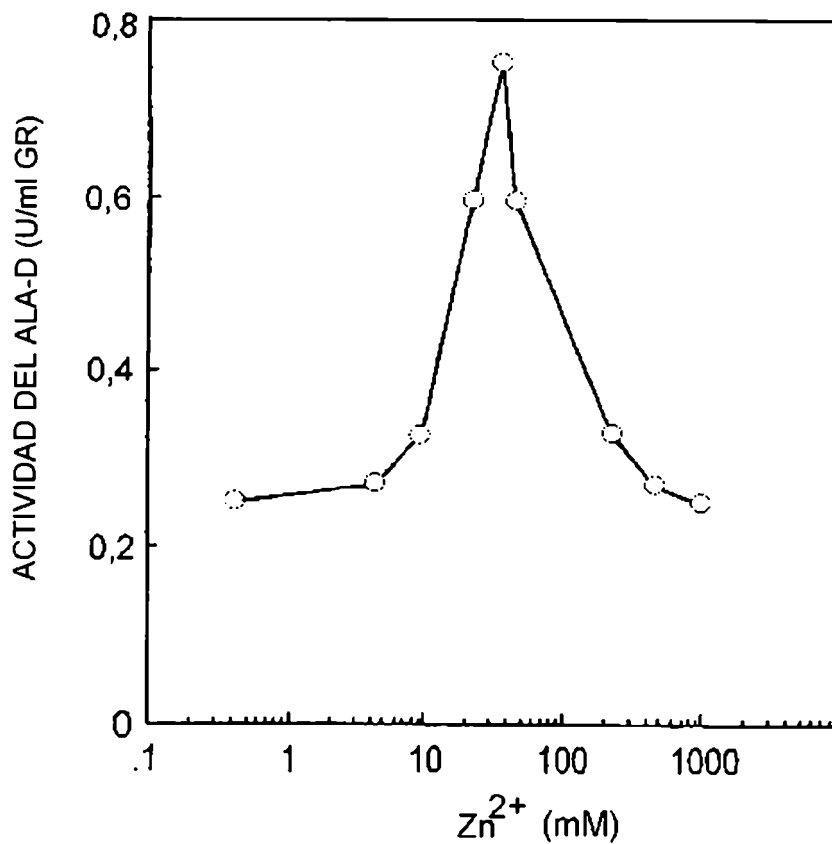


FIGURA VIII.5.: Efecto de la concentración de Zn^{2+} sobre la actividad del ALA-D en GR de pacientes HD antes de la hemodiálisis. La concentración de Zn^{2+} se representa en escala logarítmica.

El agregado de esta concentración de Zn^{2+} produjo cambios similares en la actividad del ALA-D de pacientes HD, tanto antes como después de la diálisis; sin embargo la actividad del ALA-D en presencia de Zn^{2+} fue siempre menor que en los correspondientes controles (Figura VIII.6).

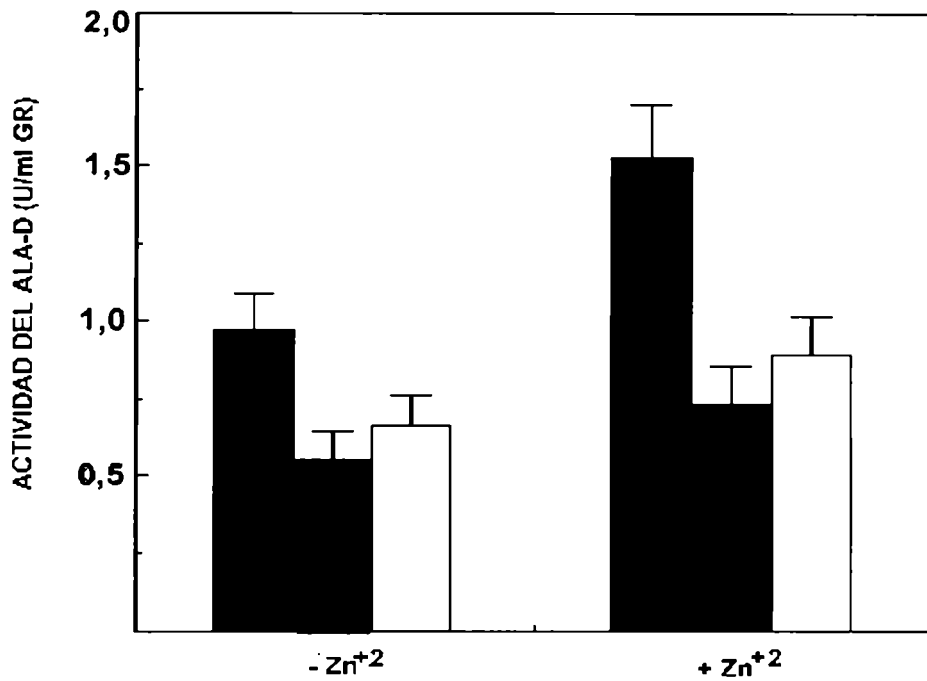


Figura VIII.6: Efecto del Zn²⁺ sobre la actividad del ALA-D en controles (■) y pacientes HD, antes (■) y después (□) de la hemodiálisis. Se agregaron al sistema de incubación iones Zn²⁺ en una concentración de 22,5 μM. Los datos corresponden a valores medios ± DS. P < 0,001.

La figura VIII.7. muestra que, modificando la temperatura del hemolizado en muestras de sangre proveniente de controles o pacientes HD, antes o después de la hemodiálisis no produce una recuperación de la actividad, en realidad ésta se reduce a temperaturas mayores.

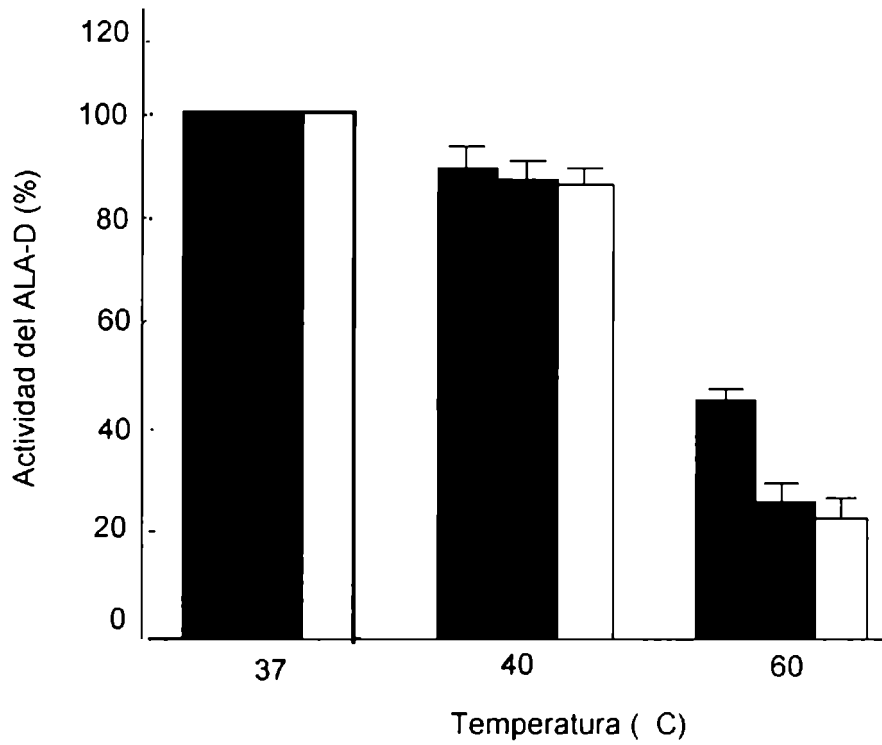


FIGURA VIII.7: Efecto del calentamiento sobre la actividad del ALA-D. Controles = (), antes (■) y después (■) de la hemodiálisis. Los datos son los porcentajes de actividad, tomando los valores de cada grupo como 100 % a 37 °C.

VIII.5. ZINC EN PLASMA

La concentración de zinc en plasma de pacientes HD, aún después de la diálisis fue significativamente ($p < 0,001$) menor ($44 \pm 12 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$) que en los controles ($105 \pm 30 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$).

Estos resultados concuerdan con datos de otros autores (Hosokawa et al, 1987), y confirman además que los niveles plasmáticos de zinc están disminuídos en pacientes HD.

VIII.6. DISCUSION y CONCLUSIONES

Se encontró que las actividades de ALA-D y Deaminasa están reducidas en la sangre de pacientes HD antes de la hemodiálisis, como consecuencia se acumulan ALA y PBG en plasma. Luego de la diálisis se reducen los niveles de ALA y normalizan los de PBG.

Correspondientemente ocurre cierta recuperación de la actividad del ALA-D y total de la Deaminasa.

Los niveles de porfirinas plasmáticas fueron normales en los pacientes HD y al mismo tiempo lo que la actividad de la enzima URO-D.

La presencia de iones amonio, conocido inhibidor de la Deaminasa, de urea y otras toxinas urémicas, antes de la diálisis, y su eliminación por diálisis, podrían explicar la actividad reducida de la Deaminasa en pacientes HD y su reactivación luego de la hemodiálisis (Sancovich et al, 1969; Kratka et al., 1990).

El ALA-D es una enzima oligomérica en la cual grupos sulfhidrilos e iones Zn^{2+} están involucrados en el sitio activo (Batlle & Stella, 1978). El plomo es un fuerte inhibidor (Bonsignore, 1963) que puede reemplazar al Zn^{2+} , y se ha demostrado que el agregado de este catión, Zn^{2+} y el calentamiento revierten la inhibición por plomo (Sakai et al, 1980).

En este trabajo hemos encontrado que el contenido de Zn^{2+} en plasma de HD es menor que en los controles, su agregado, reactiva la actividad del ALA-D, pero esto no se logra con el calentamiento, lo que nos lleva a pensar que la menor concentración de Zn^{2+} en pacientes HD y la probable presencia de algún factor inhibidor en el plasma de los pacientes HD podrían explicar la disminución de la actividad del ALA-D hallada e estos pacientes.

VIII.7. BIBLIOGRAFIA

BATLLE, A.M del C. & STELLA, A.M.: 5-aminolaevulinate dehydratase: its mechanism of action. *Int. J. Biochem.*, 9, 861-864, 1978.

BONSIGNORE, D., CALISSANO, P. & CARTASEGNA, C.: Un semplice metodo per la determinazione della 5-aminolevulico deidratase nel sangue. Comportamento dell enzima nell'intossicazione saturnina. *Med. Lav.*, 56, 199-205, 1965.

HOKOSAWA,S.; NISHITANI, H., UMEMURA, K., TOMOYOSHI, T., SAWANISHI, K. & YASHIDA, O.: Serum and corpuscular nickel and zinc in chronic hemodialysis patients. *Nephron*, 45, 151-153, 1987.

KRATKA, R.; SHULER, C. & WOLFSON, M.: Nutrition in hemodialysis and peritoneal dialysis patients. En *Clinical Dialysis* (Editado por NISSENSON, A.R., GENTILE, D.E. & FINE, R. 2nd edition) 350-365, Appleton & Lange, Norwalk, CT., 1990.

SAKAI, T.; YANAGIHARA, S. & USHIO, K.: Effect of preincubation on ALA-D inhibition by added lead. *J. Japan Acc. Med. Assoc.*, 28, 56-61, 1980.

SANCOVICH, H.; BATLLE, A.M.del C. & GRINSTEIN, M.: Porphyrin biosynthesis VI. Separation and purification of PBG deaminase and Urogen III

cosynthetase from cow liver. PBGase an allosteric enzyme., *Biochem. Biophys. Acta*, 191, 130-143, 1969.

TOMOKUNI, K.: Different behaviours of erythrocyte 5-aminolevulinic acid dehydratase. *Archs. Environ. Hlth.* 30, 148-152, 1975.

CAPITULO IX

DETERMINACION DE LOS NIVELES DE GLUTATION EN GLOBULOS ROJOS Y PLASMA

	Página
IX.1. Introducción.....	218
IX.2. Bibliografía	221

IX. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE GLUTATION EN GLOBULOS ROJOS Y PLASMA

IX.1 INTRODUCCION

Se ha encontrado que ciertas alteraciones halladas en pacientes hemodializados como anemia y la toxicidad urémica están relacionadas con un aumento del stress oxidativo. También hay evidencias de que los diferentes tipos de diálisis influyen sobre la peroxidación lipídica y el stress oxidativo (Schmidtman et al., 1990; Westhuyzen et al., 1995 y Jackson et al., 1995).

Resultó entonces de interés determinar los niveles de Glutación reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en glóbulos rojos y en plasma de pacientes HD y compararlos con las de individuos sanos controles.

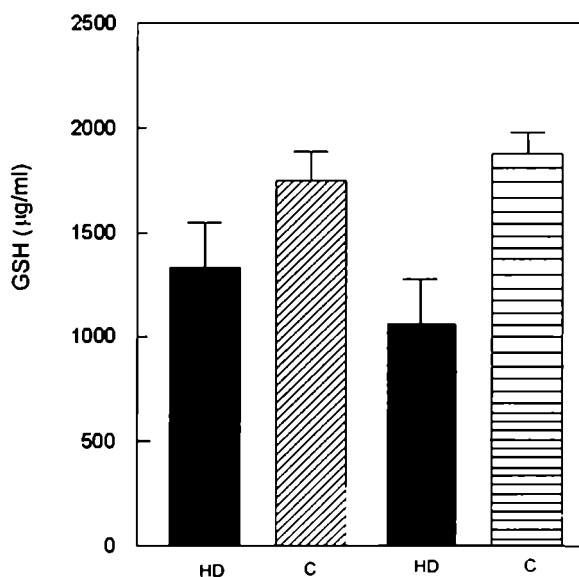


FIGURA IX.1. : Niveles de GSH en GR (■; ▨) y plasma (■; ▤) de pacientes Hemodializados (HD) e individuos controles (C).

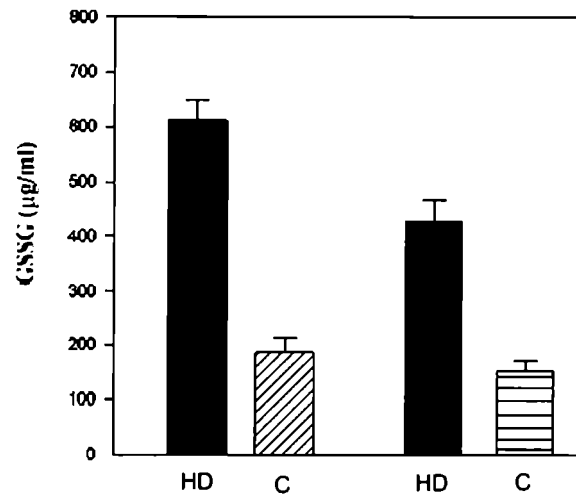


FIGURA IX.2. : Niveles de GSSG en GR (■ ; ▨) y plasma (■ ; ▤) de pacientes Hemodializados (HD) e individuos controles (C).

Tabla XI.1. : Relación entre los niveles de GSH y GSSG en GR y plasma de pacientes HD e individuos normales.

	GR		PLASMA	
	HD	C	HD	C
GSH/GSSG	2,3 ± 0,1	9,0 ± 0,3	3,75 ± 1,19	11,0 ± 0,4

Como se esperaba y se aprecia claramente en la Figuras IX.1 y IX.2, si bien la cantidad total de glutatión (reducido + oxidado) no varía, la

concentración de GSH se encuentra disminuída en los pacientes HD, mientras que la de GSSG está aumentada tanto en GR como en plasma, siempre en comparación con los niveles de individuos sanos, en consecuencia la relación entre ambos parámetros GSH/GSSG Tabla XI.1 resultará disminuída hasta 74% en GR y un 66 % en plasma, datos indicadores de la existencia de stress oxidativo.

IX.2 BIBLIOGRAFIA

JACKSON, P.; LOUGHREY, C.; LIGHTBODY, J.; Mc NAMEE, P. & YOUNG, I:
Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in
patients with chronic renal failure. Clin. Chem., 41, 1135-1138, 1995.

WESTHUYZEN, J.; ADAMS, C.& FLEMING, S.: Evidence for oxidative stress
during *in vitro* dialysis. Nephron, 70, 49-54, 1995.

SCHMIDTMANN, S.; von BAEHR, R. & PRECHT, K.: Free radicals induce
increased lysis of red blood cells after haemodialysis. Nephrol. Dial.
Transplant., 5, 600-603, 1990.

CAPITULO X

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL FACTOR PLASMATICO

	Página
X.1. Introducción.....	222
X.2. Electroforesis de las fracciones inhibitorias	223
X.3. Actividad de la enzima ALA-D de glóbulos rojos normales en presencia de proteína electroeluída	224
X.4. Electroforesis de las fracciones inhibitorias y determinación del PM del inhibidor	224
X.5. Composición de aminoácidos del inhibidor	227
X.6. Secuenciación del inhibidor.....	230

X. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL FACTOR PLASMATICO

X.1. INTRODUCCION

Para determinar ;a naturaleza del factor plasmático, se sometió al plasma de pacientes HD a calentamiento, tratamiento con TCA y tripsinización.

El calentamiento, el tratamiento con TCA y la tripsinización anularon la capacidad inhibitoria del plasma HD, lo que sugiere que el inhibidor sería de naturaleza peptídica (Tabla X.1).

TABLA X.1.: Efecto del calentamiento y tratamiento conTCA y tripsinización sobre la capacidad inhibitoria del plasma de pacientes hemodializados.

PLASMA DE PACIENTE HEMODIALIZADO (0,5 ml)	ACTIVIDAD DEL ALA-D (U/ml GR)
CALENTAMIENTO	0,969 ± 0,109
TCA	0,977±0,139
TRIPSINIZACION	0,975±0,115
CONTROL	0,975±0,115

Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

El inhibidor se aisló por cromatografía en una columna de Sephadex G-100 según se indicó en Materiales y Métodos. El plasma de los distintos pacientes mostró un perfil cromatográfico semejante, sin embargo el poder inhibitorio de las fracciones provenientes de la columna de Sephadex G-100 varió con el paciente.

La Figura X.1 muestra el perfil cromatográfico representativo de 3 plasmas HD con distinta capacidad inhibitoria (A, B, C) sobre la enzima ALA-D de GR N.

En los cromatogramas se observa que las fracciones con mayor capacidad inhibitoria sobre el ALA-D de GR N, corresponden a picos proteicos cuyos PM fueron 55 kDa y 22 kDa.

La fracción de 55 kDa fue la que produjo máxima inhibición.

X.2. ELECTROFORESIS DE LAS FRACCIONES INHIBITORIAS

La Figura X.2. A. muestra una corrida electroforética de los eluidos plasmáticos colectados que componen las fracciones inhibitorias del ALA-D de GR N, la Figura. X.2.B. muestra el cromatograma correspondiente de dicho plasma.

Como se puede ver en la tinción con Coomasie blue, existe una fracción inhibitoria que se corresponde con una única banda proteica (PM = 55 kDa). Para corroborar esto, se realizaron tinciones con plata de esta fracción que revelan la presencia de dos bandas proteicas. Una de ellas con mayor intensidad; de peso molecular 55 kDa (Figura X.3).

X.3. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ALA-D DE GLOBULOS ROJOS NORMALES EN PRESENCIA DE PROTEINA ELECTROELUIDA

Se procedió a separar la banda proteica de peso molecular 55 kDa del gel y se realizó una electroelución. Luego se determinó la actividad de la enzima ALA-D de GR, en presencia de la proteína electroeluída y concentrada, como se detalla en Materiales y Métodos.

La actividad del ALA-D de GR N disminuyó un 32 % en presencia de 541 pMoles de la proteína electroeluída del gel en el medio de incubación.

X.4. ELECTROFORESIS DE LAS FRACCIONES INHIBITORIAS Y DETERMINACION DEL PM DEL INHIBIDOR

Continuando con la caracterización del inhibidor, se realizaron corridas electroforéticas de las fracciones con capacidad inhibitoria con un SDS - PAGE. Se encontró que la fracción con mayor capacidad

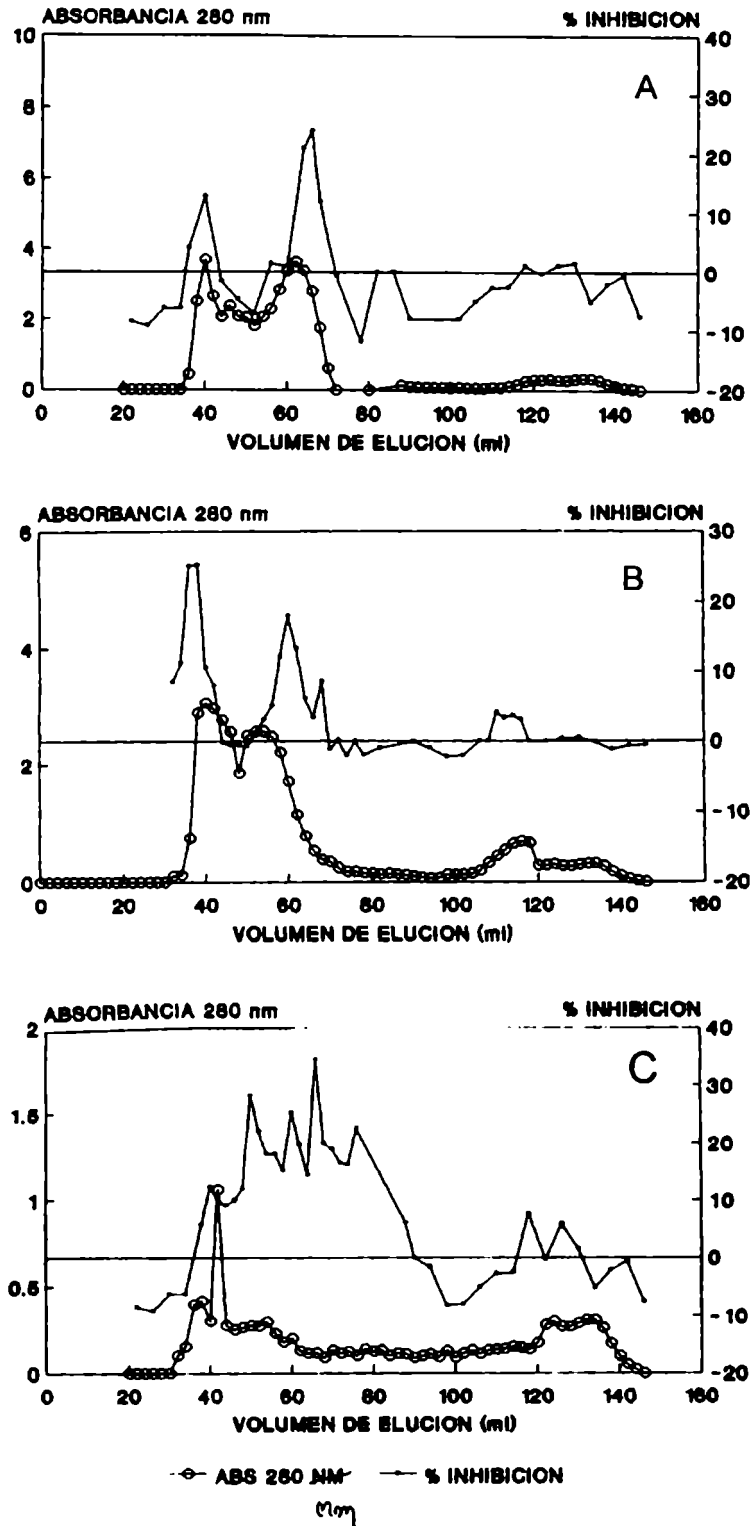
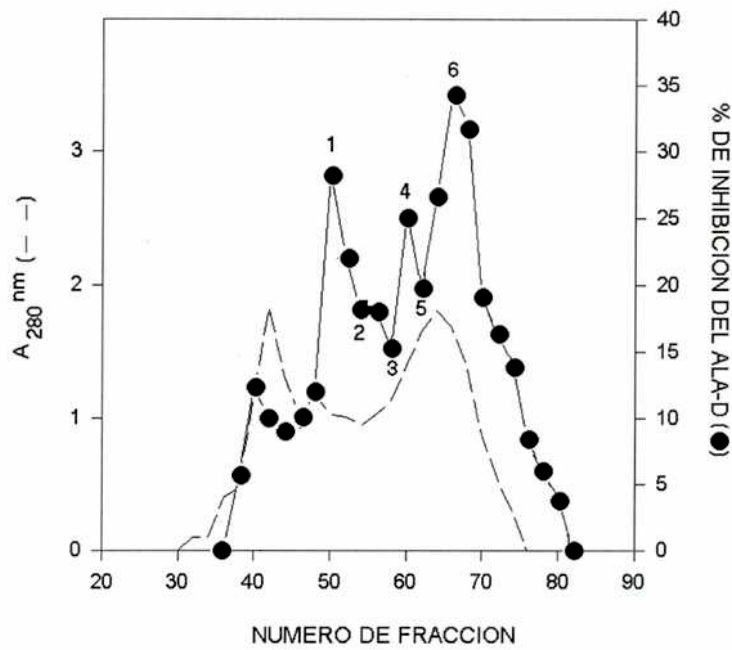
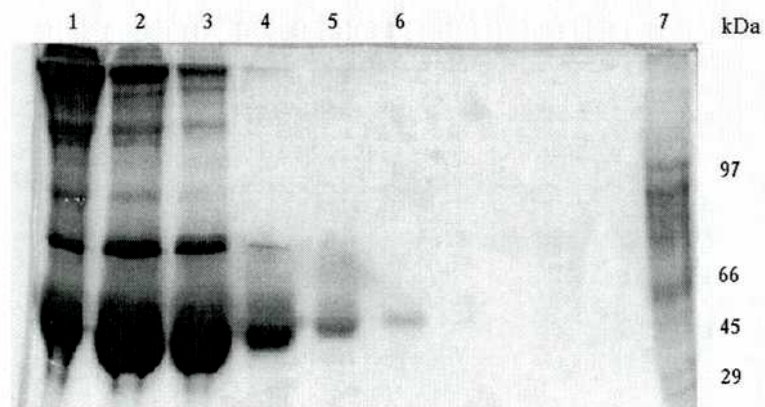


FIGURA X.1.: Perfil cromatográfico representativo de plasmas HD por sephadex G-100 a 280 nm (O). Porcentaje de inhibición de las distintas fracciones sobre la actividad de la enzima ALA-D de GRN (●). Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos.



A



B

FIGURA X.2.: Aislamiento y electroforesis del inhibidor del ALA-D. A. Cromatografía en Sephadex G-100. Las condiciones experimentales son las descritas en Materiales y Métodos. (- - -) Absorción a 280 nm, (●--●) Porcentaje de inhibición sobre el ALA-D de GR N. B. SDS-PAGE de las fracciones 1,2,3,4,5 y 6 de A. Los marcadores de peso molecular se sembraron en la calle 7.

inhibitoria, proveniente de la cromatografía por Sephadex G-100 corria una banda proteica definida, como se muestra en la Figura X.3.

Para la determinación del peso molecular en gel se sembraron fracciones con actividad inhibitoria en un gel SDS-PAGE de 12,5 % de entrecruzamiento. (Figura X.3). Se sembró una calle con proteínas de PM conocido: Seroalbúminina bovina (66 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa) y Anhidrasa carbónica (31 kDa).

El PM del inhibidor para el que consideramos el pico 6, en el SDS-PAGE fue de 56,2 kDa, en concordancia con los valores obtenidos por Sephadex G-100.

X.5. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DEL INHIBIDOR

Previamente a la secuenciación del péptido de 56,2 kDa se determinó su composición de aminoácidos. Para ello, se procedió a su aislamiento y purificación hasta banda única y con esta fracción del péptido altamente purificado se realizaron 5 experiencias separadas para el análisis de aminoácidos en 2 equipos analizadores distintos.

En todos los casos, como se indicó, se partió de muestras provenientes de una banda electroeluída de un SDS-PAGE obtenida según se indicó en Materiales y Métodos.

En una de estas experiencias el análisis se realizó con el inhibidor inmovilizado an PVDF y los 4 restantes con el inhibidor en solución. Se comprobó que el tratamiento con la membrana no produjo la pérdida de muestra. El analizador, se calibró con muestras patrones de concentraciones conocidas de distintos aminoácidos. Se analizaron 250 picomoles del patrón utilizando una columna C-18 (250 x 2,1 mm) para separar los PTC aminoácidos.

Las Figuras X.4 y X.5. muestran los perfiles de la cromatografía por HPLC del standard de aminoácidos en el analizador Beckman 7300 y el analizador Applied Biosystems 920 respectivamente.

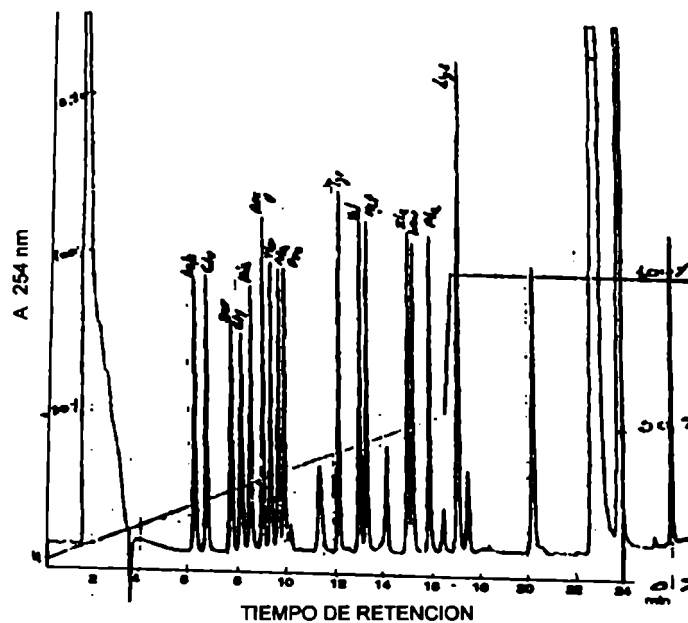
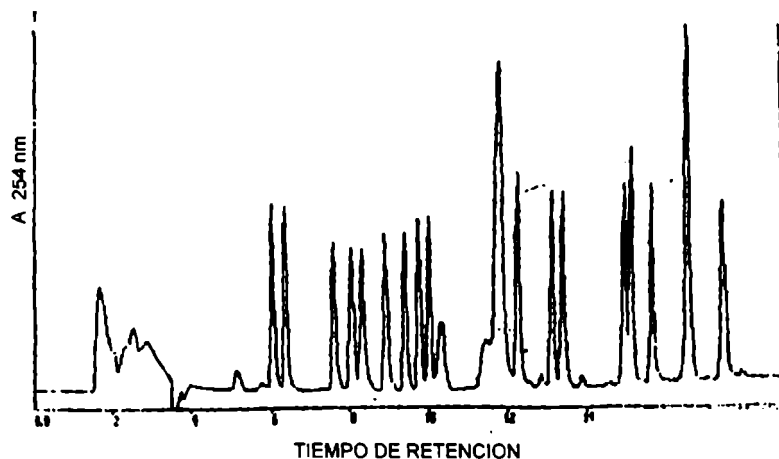


FIGURA X.4.: Separación de los PTC-aminoácidos de la muestra patrón en el analizador Beckman 7300.



Peak ID	Amino Acid	Time	Area	Height	Area/Height	Height
1	Aspartic Acid	5.83	0.15	139.85	898.20	252
2	Glutamic Acid	6.16	0.15	138.88	844.90	252
3	Serine	7.43	0.15	103.28	530.73	252
4	Glycine	7.90	0.15	96.13	502.77	252
5	Histidine	8.20	0.15	90.85	510.86	252
6	Arginine	8.83	0.15	113.26	580.80	252
7	Threonine	9.28	0.15	107.15	543.86	252
8	Alanine	9.65	0.15	128.87	640.98	252
9	Proline	9.90	0.15	126.63	642.42	252
10	Tyrosine	12.18	0.15	162.36	746.20	252
11	Valine	13.02	0.15	154.16	745.80	252
12	Methionine	13.28	0.15	143.84	707.68	252
13	Isoleucine	14.87	0.15	148.81	732.82	252
14	Leucine	15.83	0.15	163.82	867.76	252
15	Phenylalanine	15.88	0.15	147.13	735.38	252
16	Lysine	16.58	0.15	255.41	1212.88	252
17		17.38	0.15	53.81	261.87	252
18		17.82	0.15	6.84	26.86	252

FIGURA X.5.: Separación de los PTC-aminoácidos de la muestra patrón en el analizador Applied Biosystem 920.

La Figura X.6. Muestra los resultados de una de las 5 experiencias en el análisis de aminoácidos a que fue sometido el péptido inhibidor del ALA-D de plasma HD. En este caso se utilizó una de las preparaciones del péptido en solución.

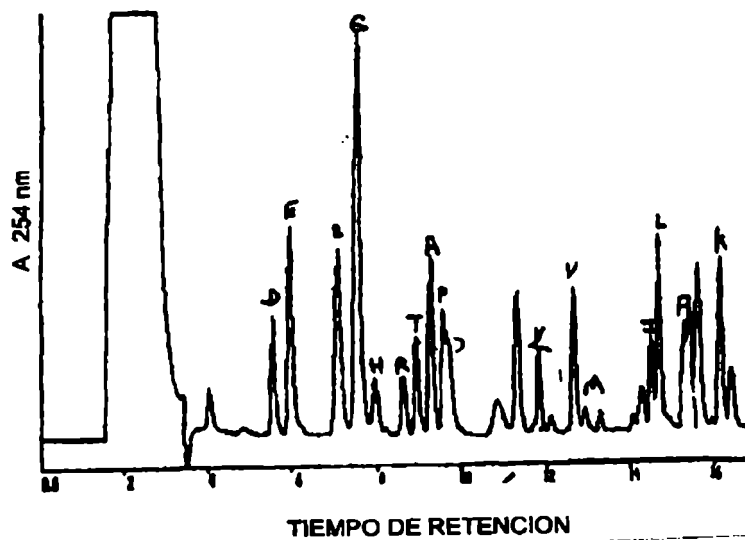


FIGURA X.6. : Separación de los PTC-Aminoácidos del péptido inhibidor del ALA-D de plasma HD en el analizador Applied Biosystems 920.

La Tabla X.2. muestra la composición de aminoácidos del inhibidor del ALA-D.

X.6. SECUENCIACION DEL INHIBIDOR

Para el primer análisis de la secuencia de aminoácidos se procedió al clivaje con bromuro de cianógeno del inhibidor inmovilizado en PVDF. De esta experiencia resultó que el inhibidor poseía el

Tabla X. Composición de aminoácidos del péptido inhibidor del ALA-D

AMINOACIDOS	NUMERO DE RESIDUOS POR MOLECULA (*)
Asx	32.8 (33)
Glx	94.7 (95)
Ser	17.5 (18)
Gly	46.2 (46)
His	9.65 (10)
Arg	12.3 (12)
Thr	7.1 (7)
Ala	40.3 (40)
Pro	19.5 (20)
Tyr	13.4 (13)
Val	54.3 (54)
Met	Nd
Cys	Nd
Ile	31.3 (31)
Leu	81.4 (81)
Phe	21.1 (21)
Lys	25.2 (25)
Trp	Nd

Nd: no determinado. (*) Los valores representan el promedio de 5 análisis.

N-terminal bloqueado, lo que imposibilitó la secuenciación directa del mismo.

Por ello se emplearon luego una serie de estrategias que se detallan en Materiales y Métodos. Es decir se trató el inhibidor con tripsina y con la enzima V.8, que nos permite producir rupturas de

uniones peptídicas internas y obtener distintos fragmentos proteicos o péptidos menores.

Para calibrar al secuenciador se utilizó un péptido patrón "test peptide" que posee la secuencia aminoacídica : H-Cys-Pro-Asp-Phe-Gly-His-Ile-Ala-Met-Glu-Leu-Ser-Val-Arg-Thr-Trp-Lys-Tyr-OH (Figura X.7.)

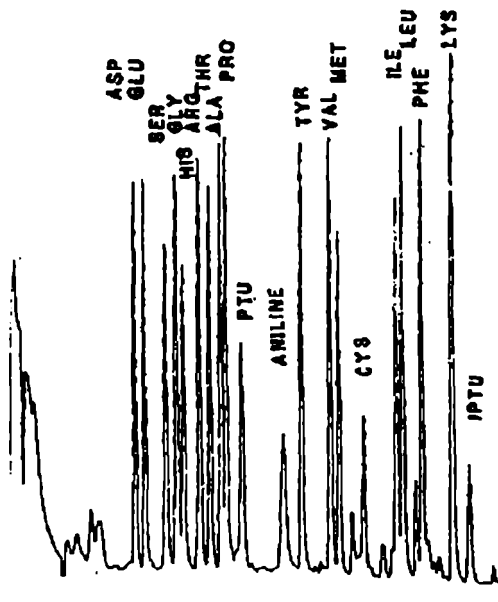


FIGURA X.7.: Recuperación de los aminoácidos del péptido patrón por HPLC.

Se realizaron 5 experiencias para determinar la secuencia de aminoácidos de los péptidos resultantes. En las Figuras X.8. y X.9. puede verse el perfil cromatográfico de los péptidos obtenidos luego de un tratamiento del inhibidor con tripsina y con la enzima V8 respectivamente.

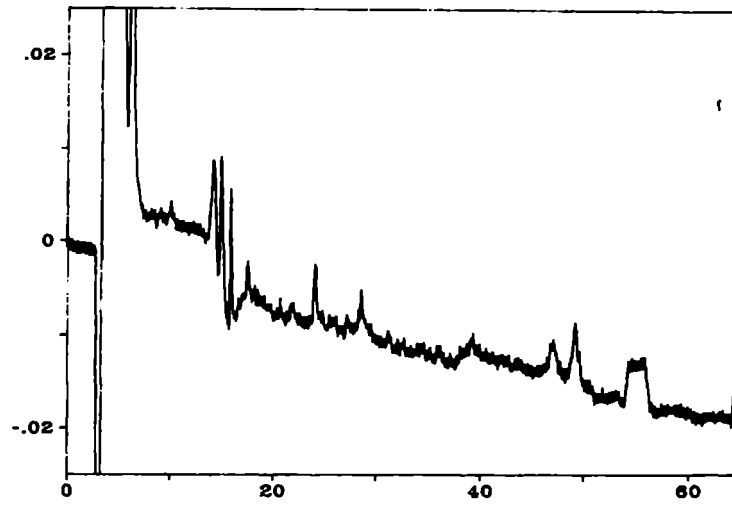


FIGURA X.8.: Separación de los péptidos obtenidos por tratamiento del inhibidor con tripsina.

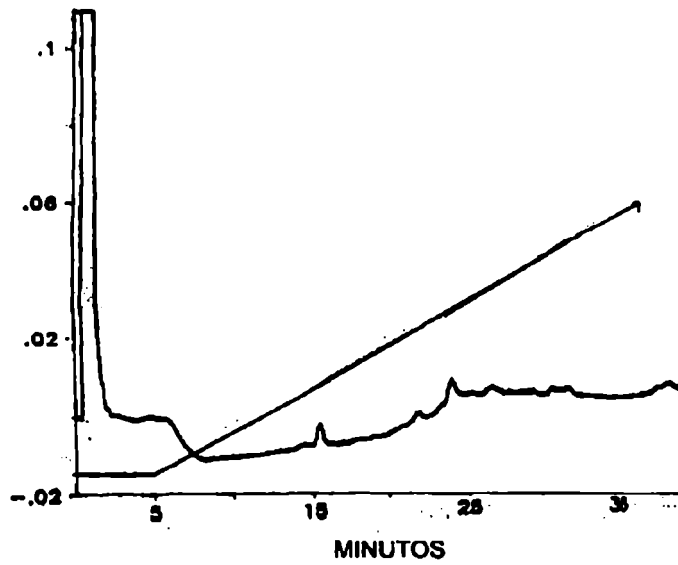


FIGURA X.9.: Separación de los péptidos obtenidos luego del Clivaje del inhibidor con enzima V.8.

De los estudios realizados se obtuvieron las siguientes secuencias internas :

1-Pro-Asp-Tyr-X-Glu

2-Pro-Ala-Ala-Glu-Asp-Glu-Arg-X-Pro

3-Tyr-Tyr-Pro

4- Ala-Phe-Ser-Tyr-Lis-Gln-Glu

Colocadas las secuencias de estos péptidos en una base de datos con secuencias conocidas no se ha podido aún identificar la del péptido inhibidor.

CAPITULO XI

ESTUDIOS CINETICOS

Página

XI.1. Determinación del Km del ALA-D de glóbulos rojos de normales y pacientes hemodializados	235
XI.2. Cinética de inhibición del péptido de 56,2 kDa sobre el ALA-D ..	237

XI. ESTUDIOS CINETICOS

XI.1. DETERMINACION DEL K_m DEL ALA-D DE GLOBULOS ROJOS DE NORMALES y DE PACIENTES HEMODIALIZADOS

Se determinó el K_m de la enzima ALA-D proveniente de glóbulos rojos de individuos controles y de pacientes hemodializados (Figura XI.1).

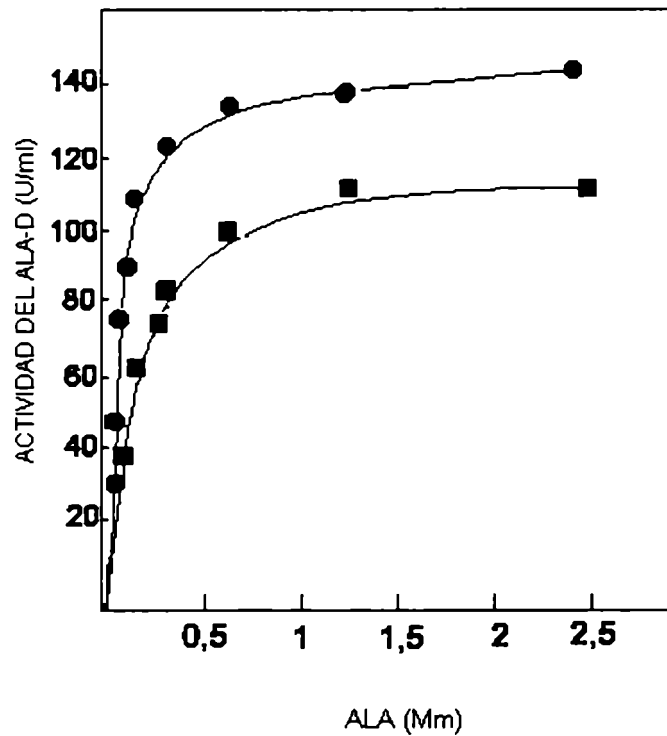


FIGURA XI.1.: Actividad de ALA-D en función de la concentración de ALA. Control (●) y HD (■). Los detalles experimentales se describen en Materiales y Métodos.

Se observa que ambas enzimas responden a una cinética michaeliana aunque la velocidad máxima del ALA-D de HD es menor que la de los controles.

Del gráfico de las inversas: se calcularon los respectivos K_m que resultaron = 0,11 mM para el ALA-D de GR N y 0,14 mM para el ALA-D de GR HD, indicando que la afinidad de la enzima inhibida con respecto al ALA sería ligeramente inferior a la de los controles.

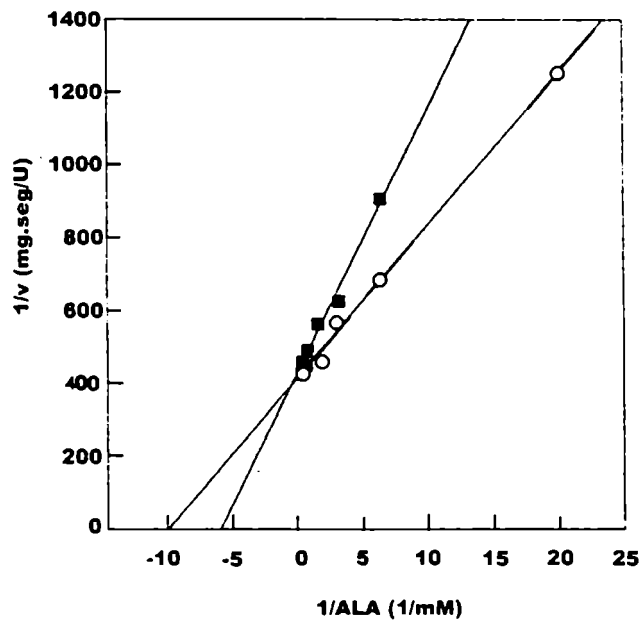


FIGURA XI.2.: Representación de Lineweaver-Burk
(○) control, (■) pacientes hemodializados.

XI.2. CINÉTICA DE INHIBICIÓN DEL PEPTIDO DE 56,2 kDa SOBRE EL ALA-D

Se puede observar que la inhibición del ALA-D, empleando concentraciones variables de la enzima control es lineal con respecto a la cantidad de inhibidor. Esto indica que hay correlación directa entre la de concentración de péptido de 56,2 kDa y su inhibición sobre la actividad del ALA-D.

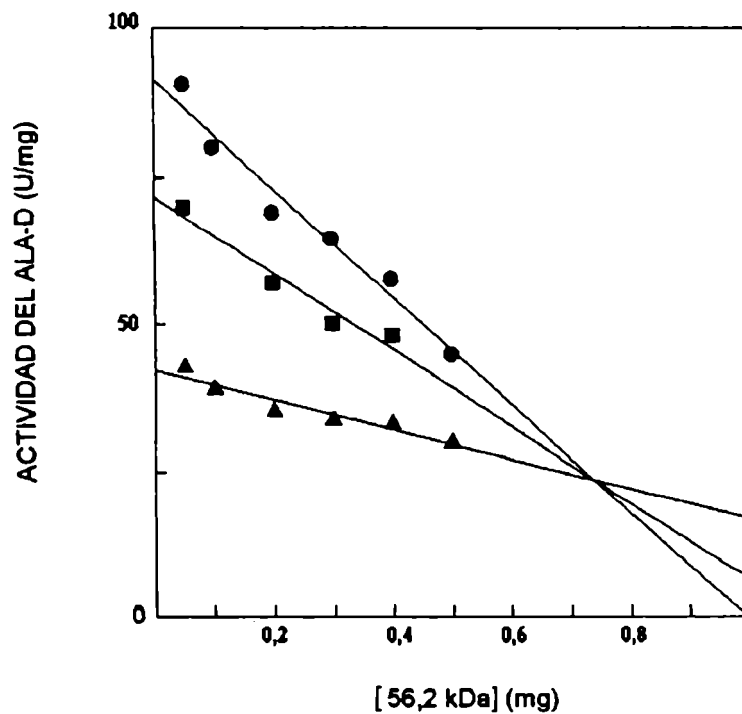


FIGURA XI.3. : Inhibición del ALA-D por el péptido de 56.2 kDa del plasma de pacientes HD. Los ensayos contienen 90 (●) ; 72 (■) y 41 (▲) U/mg de ALA-D y cantidades crecientes del péptido.

En la Figura. XI.4. se representan las inversas de la velocidad en función de las inversas de distintas concentraciones de ALA, incubando el ALA-D de normales con concentraciones variables de inhibidor de 56,2 kDa.

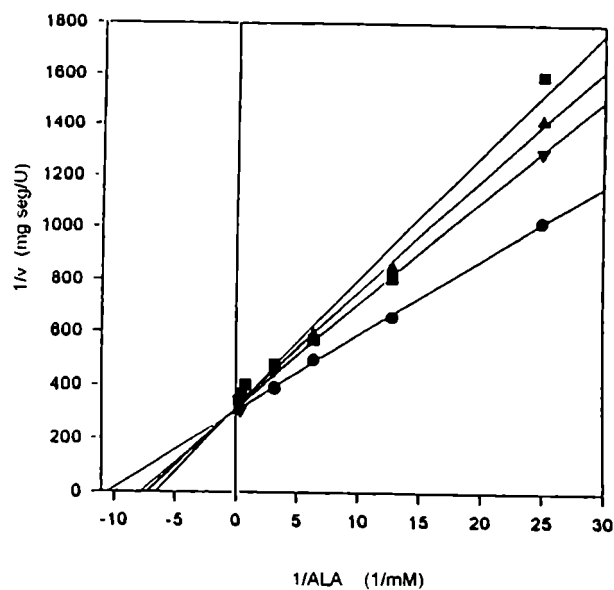


FIGURA XI.4.: Representación de Lineweaver -Burk del efecto de distintas concentraciones del inhibidor de 56,2 kDa en el medio de reacción, Sin inhibidor (●) y con 0,1mg (▼); 0,2mg (▲) y 0,5 mg (■) de inhibidor sobre el ALA-D normal.

Al cortarse todas las rectas sobre el eje de las ordenadas la inhibición es aparentemente competitiva. Para confirmarlo se realizó el gráfico 1/v en función de la concentración del Inhibidor.

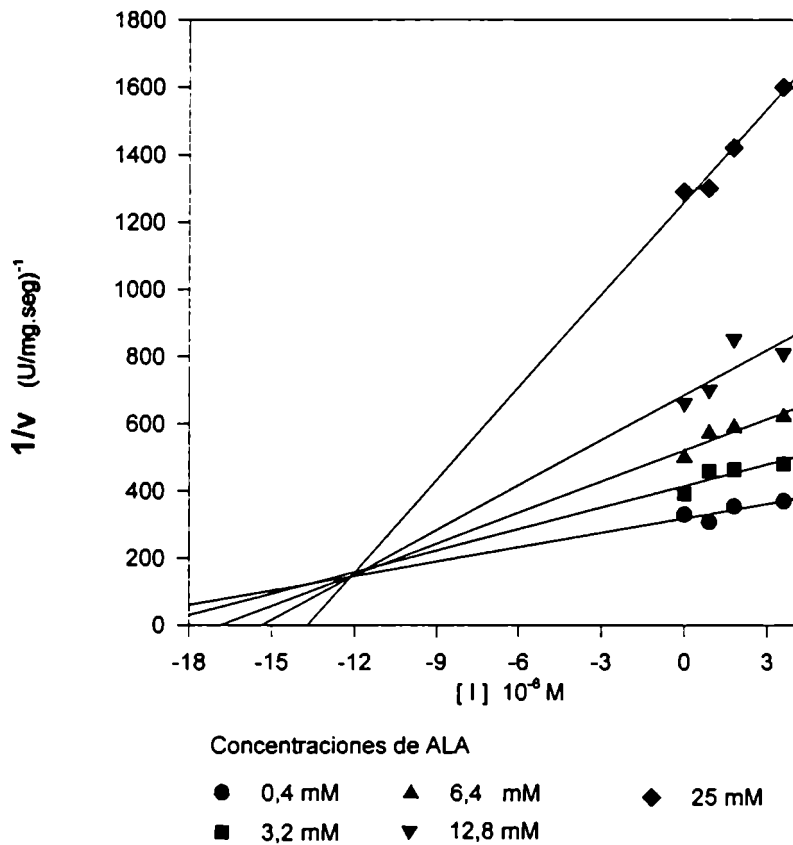


FIGURA XI.5. : Gráfica $1/v$ en función de la concentración de inhibidor.

Las gráficas resultantes en la Figura XI.5. confirman que el tipo de inhibición ejercida por el péptido es del tipo competitivo. Del gráfico también se puede calcular que el K_i es de $1,1 \cdot 10^{-6}$ M.

Los datos resultantes estarían sugiriendo que el péptido se estaría uniendo al sitio activo de la enzima compitiendo por el mismo con su sustrato.

CAPITULO XII

NIVELES DEL INHIBIDOR Y GLUTATION EN PLASMA DE PACIENTES TRANSPLANTADOS

Página

XII.1. Efecto del plasma de pacientes HD y recientemente transplantados sobre la actividad de la enzima de GR normales	240
XII.2. Niveles de glutatión en plasma de pacientes HD recientemente trasplantados y controles	241

XII. NIVELES DEL INHIBIDOR Y GLUTATION EN PLASMA DE PACIENTES TRANSPLANTADOS

XII.1. EFECTO DEL PLASMA DE PACIENTES HD Y RECIENTEMENTE TRANSPLANTADOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA ALA-D DE GR NORMALES

Como se observa en la Figura XII.1. el plasma de los pacientes con transplante renal reciente produce una inhibición menor sobre la enzima ALA-D de GR normales que el de pacientes HD.

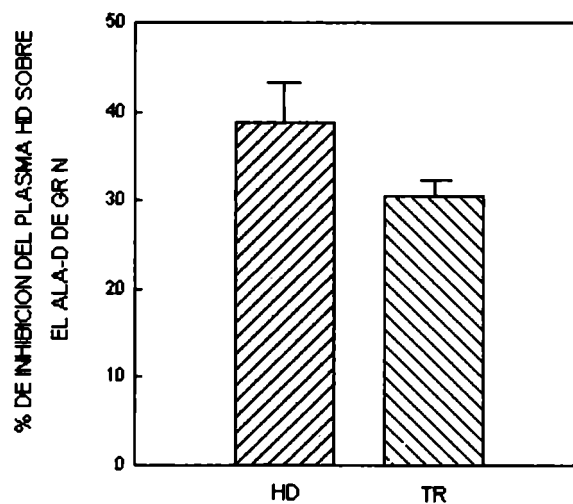


FIGURA XII.1. Efecto inhibitorio de 0,5 ml de plasma HD y de pacientes transplantados (TR) sobre el ALA-D de GRN.

Esto indicaría que luego del trasplante se reduce la concentración del péptido inhibidor lo cual lleva a una recuperación de la actividad de ALA-D.

XII.2. NIVELES DE GLUTATION EN PLASMA DE PACIENTES HD, RECIENTEMENTE TRANSPLANTADOS Y CONTROLES

Nuevamente se aprecia que los niveles de glutación total son del mismo orden en plasma de HD y controles aunque ligeramente menores en los transplantados (Figura XII.2), además se confirma que el GSH está reducido tanto en los pacientes HD como los transplantados mientras que en forma correspondiente los de GSSG

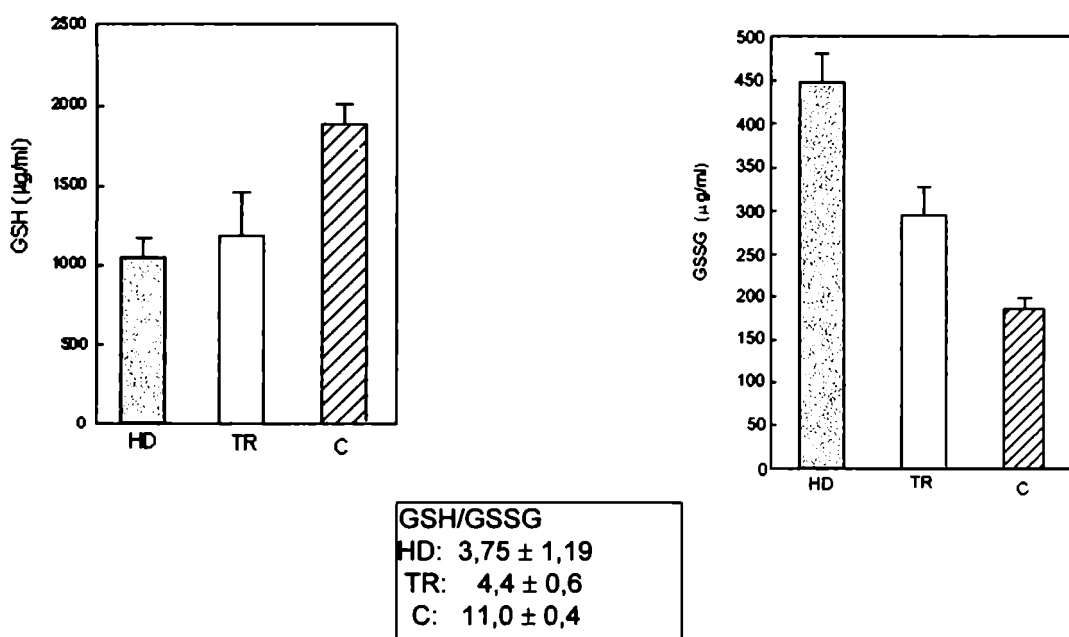


FIGURA XII.2: Niveles de GSH y GSSG en plasma de pacientes hemodializados (HD) y transplantados (TR) e individuos controles (C) y relación GSH/GSSG

GSSG están aumentados en estos mismos pacientes, comparados con los grupos controles.

Surge asimismo que la relación entre ambos parámetros GSH/GSSG, continua disminuída dentro del rango del 64-66 % en el grupo recientemente transplantado, indicando que aún no se ha logrado re-establecer el sistema de protección celular antioxidante, por lo menos con respecto una recuperación del tiol reducido.

CAPITULO XIII

EFFECTO DEL ZINC, HIERRO Y GLUTATION SOBRE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA

	Página
XIII.1. Efecto del zinc.....	243
XIII.2. Efecto del hierro.....	244
XIII.3. Efecto del glutatión.....	246

XIII EFECTO DEL ZINC, HIERRO Y GLUTATION SOBRE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA:

Para completar los estudios sobre el comportamiento cinético del péptido inhibidor del ALA-D, es que se examinó el efecto de conocidos inhibidores y activadores de la actividad enzimática que están relacionados con la insuficiencia renal crónica.

Recordemos que en estos pacientes la concentración de zinc plasmático se encuentra disminuída . Además por la severa anemia que padecen los pacientes hemodializados, la administración de hierro es un tratamiento habitual.

Por otro lado el proceso de hemodiálisis induce una producción aguda de radicales libres de oxígeno y altera la fluidez de la membrana.

XIII.1. EFECTO DEL ZINC:

Se estudió el efecto de dos concentraciones de zinc (0,1 y 0,2 mM) sobre la acción inhibitoria del péptido sobre la actividad del ALA-D. El zinc revirtió a ambas concentraciones la inhibición del inhibidor de 56,2 kDa.

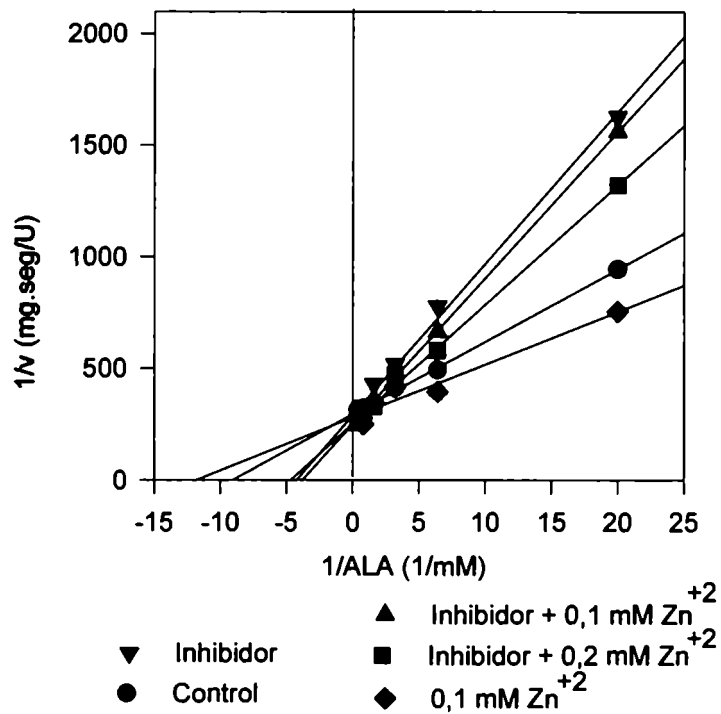


Figura XIII.1.: Efectos de la acción del zinc sobre la inhibición del péptido de 56,2 kDa sobre el ALA-D. [Inhibidor : 0,25 mg].

Estos resultados sugerirían que el zinc revierte en parte la inhibición por el péptido el cual estaría actuando en el sitio activo de la enzima, más específicamente en el sitio de unión del zinc.

XIII.2. EFECTO DEL HIERRO:

A concentraciones de hierro (0,1 y 0,01 mM) y en presencia del péptido inhibidor (Figura XIII.2.) la actividad de la enzima es aún menor

que con el péptido. La presencia de este metal sinergiza la acción inhibitoria del péptido 56.2 kDa presente en el plasma de estos pacientes.

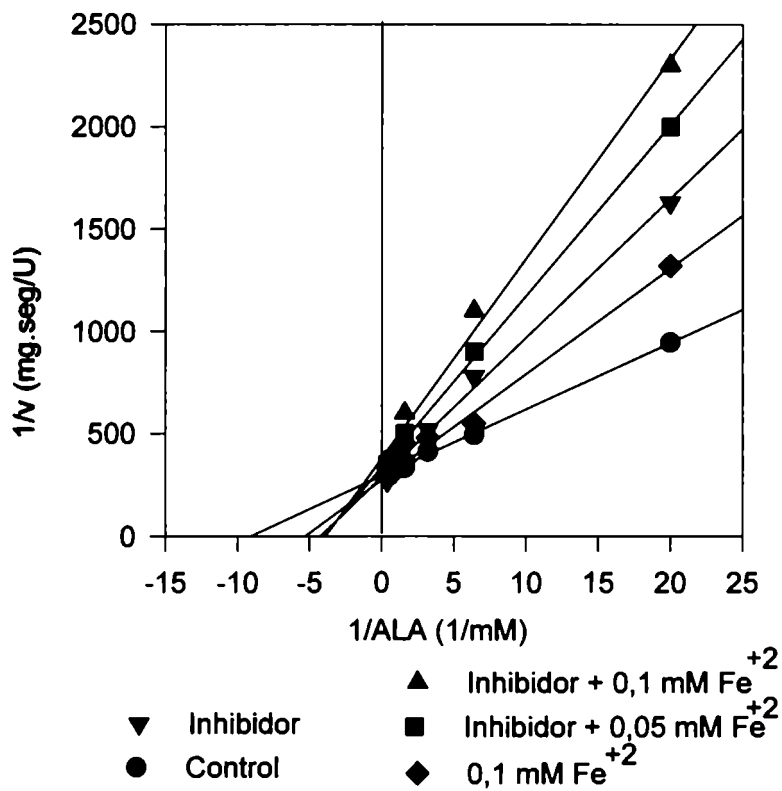


Figura XIII.2.: Efectos de la acción del hierro sobre la inhibición del inhibidor 56,2 kDa del ALA-D.

Estos resultados muestran que el hierro podría también afectar los niveles del ALA-D, a través de su acción sobre el inhibidor 56,2 kDa .

XIII.3 EFECTO DEL GLUTATION

En la Figura XIII.3. se muestra la acción del GSH sobre la actividad del inhibidor de 56.2 kDa.

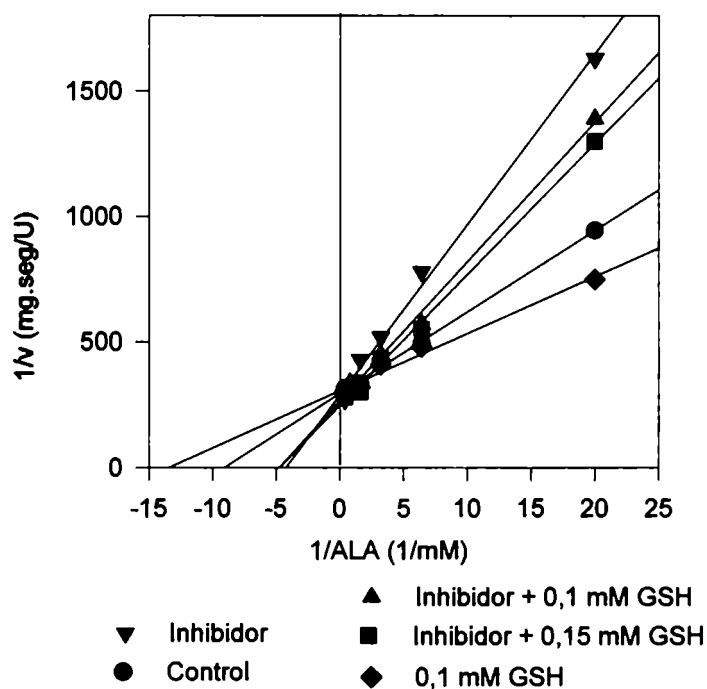


Figura XIII.3.: Efecto del GSH sobre la cinética del inhibidor [Inhibidor: 0,25 mg].

Como se observa el GSH revierte en parte la inhibición causada por el péptido de 56,2 kDa.

DISCUSION FINAL

Todas las células poseen la capacidad de biosintetizar las porfirinas, conocidas también como pigmentos vitales, pues participan de los dos procesos fundamentales para la vida, como hemoglobina y clorofilas, en la respiración y la fotosíntesis respectivamente. Es un metabolismo finamente regulado; si por causas exógenas o endógenas falla alguno de los mecanismos de control, se producen los desórdenes metabólicos identificados como Porfirias.

En las Porfirias los intermediarios (porfirinógenos, porfirinas, y sus precursores ALA y PBG) se producen en exceso y acumulan en los tejidos, lo que lleva a síntomas neurológicos o cutáneos, o a ambos.

Las pseudoporfirias no son enfermedades metabólicas, como su nombre lo expresa son una supuesta porfiria. Es decir, los pacientes pseudoporfíricos presentan síntomas clínicos semejantes a los portadores de la enfermedad genética.

Se sabe mucho acerca de las porfirias, en cambio se ha investigado poco en el tema Pseudoporfiria, en especial en pacientes hemodializados.

En consecuencia, el objetivo fundamental de este trabajo ha sido el estudio del metabolismo de las porfirinas, en pacientes hemodializados y con transplante renal reciente. -

Ha sido entonces el propósito de este trabajo, en primer lugar, el desarrollo de un modelo experimental para la pseudoporfiria del hemodializado, resultante de la acción fototóxica producida por el ácido nalidíxico administrado a animales.

Los resultados obtenidos han sido satisfactorios. El tratamiento lumínico de los animales afectó solamente la actividad de la enzima ALA-D en riñón e hígado, mientras que el tratamiento con ácido nalidíxico produjo una disminución de la actividad del ALA-D mayor en sangre que en riñón e hígado.

La combinación del ácido nalidíxico y luz suma los efectos de ambos tratamientos, siendo el efecto más sensible en sangre que en hígado y riñón, vemos que la inhibición fue cerca del 70 % en sangre y dentro del orden del 35-45 % en hígado y riñón.

Los datos obtenidos, a nivel del comportamiento de la enzima ALA-D, están indicando que la administración de ácido nalidíxico, sólo o en combinación con la irradiación con luz U.V., producen un buen modelo animal experimental de pseudoporfiria.

También son muy importantes los datos obtenidos, en cuanto a las alteraciones del camino metabólico del hemo en hemodializados.

Se encontró que las actividades de ALA-D y Deaminasa están reducidas en la sangre de pacientes HD antes de la hemodiálisis, como consecuencia se acumulan los sustratos ALA y PBG en plasma. Luego de la diálisis se reducen los niveles de ALA y normalizan los de PBG así como cierta recuperación de la actividad de la enzima ALA-D y total de la Deaminasa.

Los niveles de porfirinas plasmáticas fueron normales en los pacientes HD y al mismo tiempo lo que la actividad de la enzima URO-D.

Estos datos nos llevan a considerar desde una perspectiva clínica que la presencia de iones amonio, conocido inhibidor de la Deaminasa, de urea y otras toxinas urémicas, antes de la diálisis, y su eliminación por diálisis, podrían explicar la actividad reducida de la Deaminasa en pacientes HD y su reactivación luego de la hemodiálisis

Por otro lado el estudio de la concentración de Glutación en plasma y glóbulos rojos (GR) mostró claramente que si bien la cantidad total de glutación (reducido + oxidado) no varía, la concentración de glutación reducido (GSH) se encuentra disminuída en los pacientes hemodializados, la de glutación oxidado (GSSG) está aumentada tanto en GR como en plasma, siempre en comparación con los niveles de individuos sanos, en consecuencia la relación entre ambos parámetros GSH/GSSG resulta disminuída en GR y plasma, lo que indica la existencia de stress oxidativo que influye en las manifestaciones de la enfermedad.

Finalmente del estudio de la influencia del plasma de pacientes sobre la enzima ALA-D, se encontro un peptido plasmático, que inhibe parcialmente la actividad de la enzima ALA-D, lo que agrava el cuadro de pseudoporfiria de estos pacientes.

Los datos aportados por este trabajo contituyen una importante contribución, al conocimiento del metabolismo del hemo en pacientes hemodializados y permitirán desarrollar nuevos estudio y tratamientos terapéuticos de estos pacientes,


Lic. Marcos
Guolo

