

Tesis de Posgrado

Estudios sobre la porfobilinógeno- deaminasa de hígado y riñón de rata

Noriega, Guillermo Osvaldo

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Noriega, Guillermo Osvaldo. (1998). Estudios sobre la porfobilinógeno-deaminasa de hígado y riñón de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3022_Noriega.pdf

Cita tipo Chicago:

Noriega, Guillermo Osvaldo. "Estudios sobre la porfobilinógeno-deaminasa de hígado y riñón de rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3022_Noriega.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



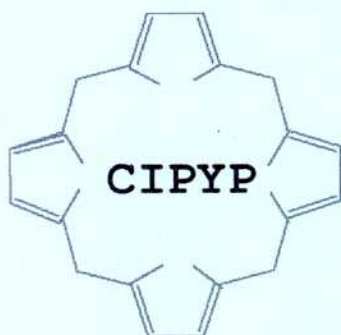
UBA

Universidad de Buenos Aires

**ESTUDIOS SOBRE LA PBG-DEAMINASA DE
HIGADO Y RIÑÓN DE RATA**

GUILLERMO OSVALDO NORIEGA

TESIS 1998



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Nº 3 022

152

2022

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

Tesis doctoral

***ESTUDIOS SOBRE LA PORFOBILINOGENO-DEAMINASA
DE HIGADO Y RIÑÓN DE RATA***

por

GUILLERMO OSVALDO NORIEGA

DIRECTORA: Prof. Dra Alcira M. del C. Batlle

CO-DIRECTORA: Prof. Dra Adela Ana Juknat

1998

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

ESTUDIOS SOBRE LA PORFOBILINOGENO-DEAMINASA DE HIGADO Y RIÑÓN DE RATA

La **porfobilinógeno-deaminasa (PBG-D)** cataliza la condensación de cuatro moléculas de porfobilinógeno (PBG) para formar el **hidroximetilbilano**, el cual en presencia de la enzima **isomerasa**, origina el **uroporfirinógeno III**, precursor fisiológico en la síntesis de hemos, clorofilas y corrinas. Dado que bajo ciertas condiciones, la PBG-D podría actuar como segundo sitio de regulación, se resolvió estudiar la PBG-D de hígado y de riñón de rata, con un enfoque cinético.

Se purificaron ambas enzimas empleando las siguientes técnicas: fraccionamiento con sulfato de amonio, filtración molecular (Sephadex G-100), intercambio aniónico (Q-Sepharosa) y cromatografía de afinidad (Blue Sepharosa). La purificación a homogeneidad de la enzima renal se logró mediante una electroforesis preparativa, que mostró una sola banda proteica con actividad, confirmada a través de Western blots. La actividad máxima se detectó en incubaciones a 65°C, a pH's 7,8 y 8,2 con una energía de activación calculada de 16,8 kcal/mol y 19,3 kcal/mol y se determinaron las masas moleculares relativas: $41,7 \pm 4,2$ kDa y $39,8 \pm 4,0$ kDa para las enzimas hepática y renal respectivamente.

La PBG-D de hígado de rata presenta un comportamiento michaeliano, con valores aparentes de K_m y V_m de $12 \pm 1,4$ μ M y $17,0 \pm 1,4$ pmoles/mg.min. respectivamente y un n de Hill de 1, determinados a pH 8,2 y a 37°C. Estudios cinéticos revelaron que los iones Mg^{2+} (0-80 mM) y fosfato (0-20 mM) actúan como inhibidores incompetitivos, mientras que el amonio (0-50 mM) y la sulfamerazina (0-2,0 mM) son inhibidores no competitivos. En cambio, el ácido fólico (0-2,0 mM) actúa como un activador no esencial de la reacción.

Para la enzima renal, los estudios cinéticos mostraron un comportamiento complejo, con una primera zona de saturación comprendida entre 5,0 y 7,0 μ M y una segunda a partir de 66-70 μ M. Los gráficos de dobles recíprocas son no lineales y exhiben un carácter bimodal que se traduce en dos constantes aparentes de afinidad, K_{m1} : $0,8 \pm 0,1$ μ M y K_{m2} : $3,5 \pm 0,4$ μ M. Comparando estas constantes cinéticas con las correspondientes para médula (K_{m1} : $0,8 \pm 0,1$ μ M y K_{m2} : $3,3 \pm 0,4$ μ M) y corteza renal (K_{m1} : $0,9 \pm 0,1$ μ M y K_{m2} : $5,1 \pm 0,6$ μ M), se sugiere que no existirían dos poblaciones proteicas distintas confinadas en diferentes estructuras. Además, la banda única obtenida (pI: 4,9) mediante la técnica de isoelectroenfoque, permitió descartar la presencia de isoformas en riñón. Estudios cinéticos revelaron que el ion sodio (0-2,0 M) produjo un desplazamiento del punto de inflexión hasta obtener gráficos de inversas con una sola pendiente. A altas concentraciones de sustrato (7-66 μ M) los iones Mg^{2+} (0-50 mM), fosfato (0-40 mM) y amonio (0-300 mM) actúan como inhibidores no competitivos. A bajas concentraciones de sustrato (0,8-7,0 μ M) el Mg^{2+} es un inhibidor incompetitivo, el fosfato presenta un efecto dual y el amonio desplaza el punto de inflexión conforme aumenta su concentración. Estudios de inhibición realizados con PCMB, NEMI y DTNB demostraron la presencia de aminoácidos cisteína en el sitio activo, lo cual fue confirmado a través de estudios de grupos ionizables en la enzima y en los complejos enzima-sustrato. Se propone para la enzima renal, la existencia de por lo menos dos estados conformacionales diferentes inducidos en el mismo sitio catalítico, ya sea por la unión del sustrato PBG o la no liberación del producto amonio o de ambos. La presencia de tales cambios conformacionales permitiría la continuidad en la unión de las otras moléculas de PBG al sitio S, en presencia de intermediarios ES_1 , ES_2 o ES_3 en el sitio C, lo que originaría una diferente afinidad y actividad catalítica final. Estos reordenamientos podrían producir finalmente cambios en los pasos limitantes de la reacción, lo cual sucedería a diferentes concentraciones de sustrato y daría lugar entonces a distintas constantes cinéticas.

Palabras claves: porfobilinógeno-deaminasa, porfirinas, constantes cinéticas, hígado, riñón.

A mis queridos padres

Indice General

Página

Agradecimientos.....

Abreviaturas.....

Objetivos.....

INTRODUCCION

CAPITULO I: Estructura tetrapirrólica y biosíntesis de porfirinas

I.1.	Introducción.....	1
I.2.	Porfirinas: Nomenclatura y estructura.....	2
I.3.	Porfirinógenos.....	4
I.4.	Biosíntesis de porfirinas.....	4
I.5.	Bibliografía.....	23

CAPITULO II: Biosíntesis de uroporfirinógenos

II.1.	Introducción.....	30
II.2.	Propiedades generales.....	30
II.3.	Estudios cinéticos.....	34

II.4.	Presencia de un dipirrometano como cofactor de la PBG-D. Mecanismo de acción.....	36
II.5.	Evidencias acerca del sitio activo de la PBG-D.....	41
II.6.	Algunos aspectos genético-moleculares.....	44
II.7.	Bibliografía.....	45

CAPITULO III: Regulación y Porfirias

III.1.	Regulación de la biosíntesis de porfirinas.....	50
III.2.	Porfirias.....	56
III.3.	Bibliografía.....	63

CAPITULO IV: El riñón y los mecanismos de la porfiria renal

IV.1.	Introducción.....	66
IV.2.	Anatomía funcional del riñón.....	67
IV.3.	La función renal.....	70
IV.4.	Mecanismos de la porfiria renal.....	72
IV.5.	Bibliografía.....	78

MATERIALES Y METODOS

CAPITULO I: Materiales

I.1.	Animales.....	80
------	---------------	----

	Página
I.2. Reactivos.....	80
I.3. Geles y columnas.....	81
I.4. Equipos.....	81
I.5. Bibliografía.....	83

CAPITULO II: Métodos

II.1. Preparación de los extractos enzimáticos.....	84
II.2. Columnas	85
II.3. Sistema de incubación de la enzima PBG-Deaminasa.....	86
II.4. Determinaciones.....	87
II.5 Electroforesis	94
II.6 Masa molecular relativa (Mr).....	96
II.7. Tratamiento de datos.....	97
II.8. Bibliografía	98

RESULTADOS

CAPITULO I: Optimización del sistema de incubación de la PBG-Deaminasa de hígado y riñón de rata

I.1. Introducción.....	99
------------------------	----

	Página
I.2. Condiciones de extracción de la PBG-D de hígado y riñón de rata.....	99
I.3. Optimización del sistema de incubación.....	103
I.4. Efecto del estacionamiento sobre la actividad de la enzima.....	112
 CAPITULO II: Purificación y masa molecular de la PBG-Deaminasa de hígado y de riñón de rata	
II.1. Ensayos preliminares.....	114
II.2. Purificación de la PBG-D hepática.....	118
II.3. Purificación de la PBG-D renal.....	123
II.4. Masa molecular relativa.....	127
 CAPITULO III: PBG-Deaminasa de hígado de rata. Estudios cinéticos	
III.1. Introducción.....	128
III.2. Estudios de velocidades iniciales.....	128
III.3. Efecto de iones.....	131
III.4. Efecto del ácido fólico.....	149
III.5. Efecto de la sulfamerazina.....	156
 CAPITULO IV: PBG-Deaminasa de riñón de rata. Estudios cinéticos	
IV.1. Estudios de velocidades iniciales.....	160

IV.2. Cinética de la PBG-D de riñón de rata en fracciones enzimáticas con distinto grado de purificación.....	167
IV.3. Discriminación de modelos. Error residual.....	174

CAPITULO V: Electroforesis

V.1. Medición de la actividad enzimática en geles de poliacrilamida.....	183
V.2. Electroforesis preparativa.....	184
V.3. Western blot.....	186
V.4. Isoelectroenfoque.....	188

CAPITULO VI: PBG-Deaminasa de riñón de rata. Acción de distintos efectores sobre la cinética de la reacción

VI.1. Acción de una mezcla de NaCl-MgCl ₂	195
VI.2. Efecto de iones.....	195
VI.3. Acción de distintos efectores sobre la actividad de la PBG-D de riñón de rata.....	

CAPITULO VII: Efecto del pH sobre la cinética de la reacción

VII.1. Introducción.....	222
VII.2. Efecto del pH sobre la cinética de la reacción.....	222
VII.3. El protón como efector de la PBG-D de riñón de rata.....	226

	Página
VII.4. Cálculo de las constantes de ionización.....	230
BIBLIOGRAFIA.....	233
 CONCLUSIONES	
I. Porfobilinógeno-deaminasa de hígado y riñón de rata. Aislamiento, purificación y propiedades.....	240
II. Estudios cinéticos de la PBG-D de hígado de rata.....	242
III. Electroforesis.....	243
IV. Estudios cinéticos de la PBG-D de riñon de rata.....	243
V. Acción de distintos efectores sobre la cinética de la reacción de la PBG-D de riñón de rata.....	247
VI. Efecto del pH.....	248
VII. Conclusiones finales.....	249
VIII. Bibliografía.....	250

AGRADECIMIENTOS

- Deseo expresar mi agradecimiento a:
- Alcira, por haber confiado en mí y haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección.
- Ana Adela, por su dedicación en la codirección de esta tesis.
- Carina, por su constante apoyo y compañerismo.
- Fernando, por su eficaz y generosa cooperación en el diseño y edición de este trabajo.
- Noemí Steyerthal, por su valiosa colaboración en la realización del isoelectroenfoque.
- todos los integrantes del CIPYP por todo lo que hemos compartido.
- al CONICET por los subsidios otorgados para la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

AIA	Alilisopropilacetamida
ALA	Acido δ -aminolevúlico
ALA-D	Acido δ -aminolevúlico dehidrasa
ALA-S	Acido δ -aminolevúlico sintetasa
Copro	Coproporfirina
Coprogen	Coproporfirinógeno
CPG-asa	Coproporfirinógeno oxidasa
DDC	3,5-dicarbetoxi-1,4 dihidrocolidona
DOVA	Acido γ - δ -dioxovalérico
DOVA-T	Acido γ - δ -dioxovalérico transaminasa
DTNB	2,2' dinitro-5,5' ditiobenzoico
DTT	Ditiotreitrol
GABA	Acido γ -aminobutírico
GSH	Glutación reducido
HAD	Hormona antidiurética
HCB	Hexaclorobenceno
HMB	Hidroximetilbilano
HMB-S	Hidroximetilbilano sintetasa
HMM	Hidróxido de metilmercurio
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
Mr	Masa molecular relativa
NEMI	N-etil-maleimida
PAI	Porfiria aguda intermitente
PCMB	p-Cloromercuribenzoato
PCT	Porfiria cutánea tarda
PBG	Porfobilinógeno
PBG-D	Porfobilinógeno deaminasa
PBG-asa	Porfobilinogenasa
Proto	Protoporfirina

Protogen

ROS

SMZ

Tris

Uro

Uro-D

Urogen

Uro I- S

Protoporfirinógeno

Especies reactivas de oxígeno

Sulfamerazina

Trihidroximetil amino metano

Uroporfirina

Uroporfirinógeno decarboxilasa

Uroporfirinógeno

Uroporfirinógeno I-sintetasa

En las figuras, tablas o esquemas

I-

Pertenece a la Introducción

M-

Pertenece a Materiales y Métodos

R-

Pertenece a Resultados y Discusión

OBJETIVOS

La **porfobilinógeno-deaminasa (PBG-D)** cataliza la tetrapolimerización del monopirrol porfobilinógeno (PBG) dando origen al hidroximetilbilano (HMB) o preuroporfirinógeno, que actúa como sustrato de la uroporfirinógeno III cosintetasa o isomerasa, formando el uroporfirinógeno III, tetrapirrol cíclico precursor de hemos, clorofilas y corrinas.

El **hemo**, cuya estructura corresponde a una hierroprotoporfirina IX, constituye el grupo prostético de una gran cantidad de proteínas y de esta forma cumple un papel relevante en procesos tales como transporte de oxígeno, generación de energía celular, reacciones de detoxificación, reducciones mediadas por peroxidasas, regulación de la biosíntesis de proteínas, desarrollo celular, etc.

La biosíntesis de **porfirinas**, atributo de todas las células, está finamente regulada. Cuando estos mecanismos de control fallan o son defectuosos la acumulación de intermediarios en este camino metabólico puede alcanzar niveles superiores a los normales. Como consecuencia se producen una serie de desórdenes metabólicos conocidos como **porfirias**.

En humanos, la existencia de una deficiencia genética a nivel de la actividad de la enzima PBG-D en hígado, eritrocitos, fibroblastos y linfocitos, da origen a la **porfiria aguda intermitente (PAI)**, enfermedad hereditaria transmitida con carácter autosómico dominante. Esta patología se caracteriza bioquímicamente por una sobreproducción hepática de ácido δ -aminolevúlico (ALA) y PBG, metabolitos excretados por orina.

La PAI se caracteriza por síntomas clínicos tales como fuertes dolores abdominales de tipo cólico, vómitos, estreñimiento, hiponatremia y debilidad en los miembros. Sin embargo, los síntomas más importantes son los que involucran los sistemas nerviosos central y periférico, tales como disturbios emocionales, confusión,

estados de agitación, ansiedad, alucinación, delirio, depresión y neuropatía motora. Actualmente se conocen una gran cantidad de drogas que pueden desencadenar una crisis de porfiria aguda, siendo las más comunes los hipnóticos, barbitúricos, sulfonamidas, esteroides, anestésicos y alcohol.

Se ha estudiado extensamente la biosíntesis de porfirinas en hígado de distintas especies animales, pero es muy poca la información existente acerca del metabolismo de las porfirinas en riñón. Más aún, se desconoce si existen mecanismos intrarrenales que puedan contribuir a aumentar la eliminación de ALA y PBG por orina, en pacientes con PAI. Sin embargo, experiencias previas revelaron altos niveles de PBG en riñón, luego de una inyección ip de ALA. Dado que bajo ciertas condiciones, la PBG-D podría actuar como segundo sitio de regulación del camino biosintético de las porfirinas, se decidió estudiar esta enzima en riñón, comenzando con su purificación y caracterización, en condiciones normales.

Sobre esta base, se resolvió efectuar un análisis comparativo entre la PBG-D de hígado y la de riñón de rata, con un enfoque especial hacia aspectos cinéticos. Para tal fin, inicialmente se planeó optimizar las condiciones de extracción y de medición de actividad de ambas enzimas. Una vez concluida esta etapa se ensayaron distintas técnicas de fraccionamiento para establecer los pasos adecuados de purificación. Finalmente, se realizaron distintas corridas electroforéticas de la PBG-D purificada de riñón de rata para evaluar la presencia de isoformas.

Se ha descripto a las sulfonamidas como desencadenantes de crisis de porfiria aguda y entre ellas a la sulfamerazina como inhibidor de la PBG-D de eritrocitos, tanto *in vivo* como *in vitro*. Por otro lado, teniendo en cuenta que uno de los tratamientos que se aplican a pacientes con PAI consiste en la administración de ácido fólico, se estudió la acción de ambas drogas sobre la biosíntesis de porfirinas en fracciones de PBG-D de hígado y riñón de rata, con distinto grado de purificación.

Con la enzima proveniente de diferentes etapas de purificación se llevaron a cabo estudios de comportamiento cinético tanto en ausencia como en presencia de distintos efectores. Se ha demostrado que en ciertas fuentes, los iones sodio, magnesio y fosfato afectan en diferente forma y grado la actividad de esta enzima. En incubaciones a distintos tiempos y variando la concentración del sustrato PBG, se analizó el efecto de estos iones sobre la cinética de la reacción de la PBG-D de ambas fuentes.

Tanto el amonio como la hidroxilamina han sido empleados frecuentemente como inhibidores de la PBG-D, con el objeto de acumular intermediarios polipirrólicos. Se resolvió entonces investigar la acción del amonio sobre la actividad de estas enzimas.

Por otro lado y dado que el pH cumple un rol fundamental en el funcionamiento normal del riñón, fue de interés estudiar la respuesta de la cinética de la PBG-D frente a variaciones de pH.

INTRODUCCION

CAPITULO I

Estructura tetrapirrólica y biosíntesis de porfirinas

	Página
I.1. Introducción.....	1
I.2. Porphinas: Nomenclatura y estructura.....	2
I.3. Porphinógenos.....	4
I.4. Biosíntesis de porfirinas.....	4
I.4.1 Biosíntesis del ácido δ -aminolevúlico (ALA).....	5
I.4.2 Biosíntesis de porfobilinógeno (PBG).....	8
I.4.3 Formación de uroporphirinógenos.....	14
I.4.4 Decarboxilación de uroporphirinógenos.....	15
I.4.5 Síntesis de protoporphirinógeno IX.....	17
I.4.6 Oxidación de protoporphirinógeno IX a protoporfirina IX.....	18
I.4.7 Obtención de hierro-protoporfirina IX.....	20

I.5.	Bibliografía.....	23
------	-------------------	----

I. ESTRUCTURA TETRAPIRROLICA Y BIOSINTESIS DE PORFIRINAS

I.1. Introducción

La importancia de las porfirinas radica en las múltiples funciones biológicas en las que participan los quelatos que forman estos compuestos con el hierro, el magnesio y el cobalto.

El hemo (hierroprotoporfirina IX) es el grupo prostético de una gran cantidad de proteínas y de esta forma cumple un papel relevante en procesos tales como transporte y almacenamiento de oxígeno, generación de energía celular, reacciones de detoxificación, reducciones mediadas por peroxidasas, biosíntesis de algunos esteroides, regulación de la biosíntesis de proteínas, desarrollo celular, etc.

Mientras que en los organismos fotosintéticos el camino de las porfirinas conduce hacia las clorofilas y bacterioclorofilas (quelatos de magnesio con derivados de protoporfirina IX), además de hemoproteínas, en el resto de los seres vivos lo hace sólo hacia el hemo; si bien debe tenerse presente que en algunas bacterias la bifurcación hacia la vía de las corrinas (quelatos de cobalto con derivados del uroporfirinógeno III) es también de importancia. Por otro lado la corrina forma parte de la estructura de la vitamina B₁₂, conocida como cobalamina, la cual es esencial para la maduración y el desarrollo de los eritrocitos, su carencia produce trastornos tales como la anemia perniciosa.

I.2. Porphirinas: Nomenclatura y estructura

Las porfirinas están constituidas por un núcleo básico que consiste en un macrociclo de cuatro anillos pirrólicos, unidos por cuatro puentes meteno. Debido a la existencia de dobles enlaces conjugados entre los 16 átomos de carbono internos resulta una estructura plana, resonante y muy estable.

De acuerdo con la nomenclatura de Fischer (Fischer & Orth, 1940), los anillos pirrólicos se denominan A, B, C y D y los cuatro puentes meteno α , β , γ y δ . Los carbonos externos de los anillos se numeran de 1 a 8 comenzando por el anillo A (Figura I-I.1). Distintos sustituyentes pueden unirse a estos átomos de carbono. La variedad y posición relativa de los mismos en el macrociclo dan lugar a la formación de las distintas porfirinas. En la Tabla I-I.1 se muestran las porfirinas de interés biológico.

Debido a su estructura, es posible asignarle a las porfirinas distintos isómeros de posición. La uro- y la coproporfirina (URO y COPRO) poseen sólo dos tipos de grupos sustituyentes, los restos acético y propiónico; por lo tanto son factibles 4 isómeros, de los cuales se consideraba que solamente dos, el I y el III, se encontraban en la naturaleza, siendo el isómero III el intermediario fisiológico, en tanto que el I es patológico. Mediante el empleo de cromatografía líquida de alta presión se ha podido detectar la presencia de coproporfirina II y IV en orina humana, estableciéndose que estos isómeros son constituyentes normales de la misma (Jacob *et al.*, 1989).

La protoporfirina (PROTO) tiene tres sustituyentes diferentes: metilo, vinilo y propiónico, dando lugar a 15 posibles isómeros. En las células sólo se ha encontrado Proto IX, proveniente de la serie isomérica III.

La estructura altamente conjugada de dobles enlaces alternados que exhiben las porfirinas es responsable de su típico espectro de absorción en la región visible y ultravioleta cercano y de la intensa fluorescencia roja que emiten al ser irradiados con luz UV.

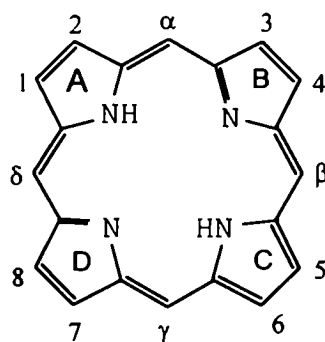


Figura I-I.1: Estructura de una porfirina y nomenclatura según Fischer.

Tabla I-I.1: Porfirinas de interés biológico

NOMBRE	SUSTITUYENTE							
Numeración de Fischer	1	2	3	4	5	6	7	8
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: -CH₃; E: -C₂H₅; A: -CH₂COOH; P: -CH₂CH₂COOH; V: CH=CH₂; HE: CHOHCH₃

Estos compuestos tienen un espectro de absorción característico con un máximo entre los 400-410 nm, la banda que aparece dentro de estos valores de longitud de onda recibe el nombre de Banda de Soret y la misma se emplea para la cuantificación de estos pigmentos.

Las porfirinas no complejadas muestran fluorescencia intensa en el rojo por excitación a 400 nm. En soluciones ácidas se encuentran bandas de emisión que corresponden a las dos bandas de absorción a mayor longitud de onda. Los espectros de fluorescencia muestran gran dependencia con el pH y la fuerza iónica (Polo *et al.*, 1988).

La solubilidad en agua aumenta con la cantidad de restos carboxílicos en las cadenas laterales. Con 8 cadenas ácidas la uroporfirina es la más soluble, mientras que la protoporfirina con sus dos cadenas de ácidos es la menos hidrosoluble. De esta manera se justifica que la uroporfirina se excrete principalmente por orina, la coproporfirina (4 cadenas ácidas) por orina y heces y la protoporfirina solamente por materia fecal.

I.3. Porfirinógenos

Los porfirinógenos son hexahidroderivados de las porfirinas y constituyen los verdaderos intermediarios biológicos del camino biosintético del hemo. Son compuestos incoloros pero cuando se excretan se oxidan espontáneamente a las correspondientes porfirinas; no fluorescen a la luz ultra violeta debido a la desaparición del sistema de dobles ligaduras conjugadas existente en las porfirinas.

I.4. Biosíntesis de porfirinas

Se puede considerar que la síntesis de tetrapirroles es un atributo fundamental de todas las formas de vida, ya que exceptuando a los virus y algunas bacterias procariontes, todos los organismos pueden sintetizar sus porfirinas siguiendo una

secuencia de reacciones catalizadas enzimáticamente, cuyas etapas son comunes hasta la formación de Proto IX. Posteriormente se producen bifurcaciones en este camino, que pueden conducir a la biosíntesis de hemo, clorofilas y bacterioclorofilas, de acuerdo con las necesidades del organismo. En el caso de las corrinas la bifurcación se produce a partir de la síntesis de uroporfirinógeno III. Las enzimas involucradas en la biosíntesis de porfirinas son ocho, la primera y las tres últimas están localizadas en mitocondrias, mientras que las cuatro restantes son citosólicas. En la Figura I-I.2 se esquematiza el camino biosintético del hemo.

I.4.1 Biosíntesis del ácido δ -aminolevúlico (ALA)

La biosíntesis de porfirinas comienza con la formación del ácido δ -aminolevúlico (ALA) a partir de glicina y succinil-CoA por acción de la enzima δ -aminolevúlico sintetasa (ALA-S), o bien desde precursores de cinco átomos de carbono tales como glutamato, glutamina ó 2-cetoglutarato, a través del ácido 4,5 dioxovalérico (DOVA) como intermediario.

EL ALA-S se detectó en diversos organismos y tejidos, como por ejemplo en *Rhodopseudomonas spheroides* (Kikuchi *et al.*, 1958), levaduras (Porra *et al.*, 1972), células hepáticas de aves (Granick, 1966) y mamíferos (Granick & Urata, 1963; Marver *et al.*, 1966a,b).

En la mayoría de los tejidos estudiados esta enzima se encuentra asociada a la fracción particulada, sin embargo en animales tratados con alilisopropilacetamida (AIA), compuesto que se comporta como un inductor exógeno, se encontró un aumento de su actividad en el citosol (Hayashi *et al.*, 1969). Esto puede deberse a formas recientemente sintetizadas de la enzima en tránsito desde los ribosomas hacia las mitocondrias (Hayashi *et al.*, 1969; Patton & Beattie, 1973).

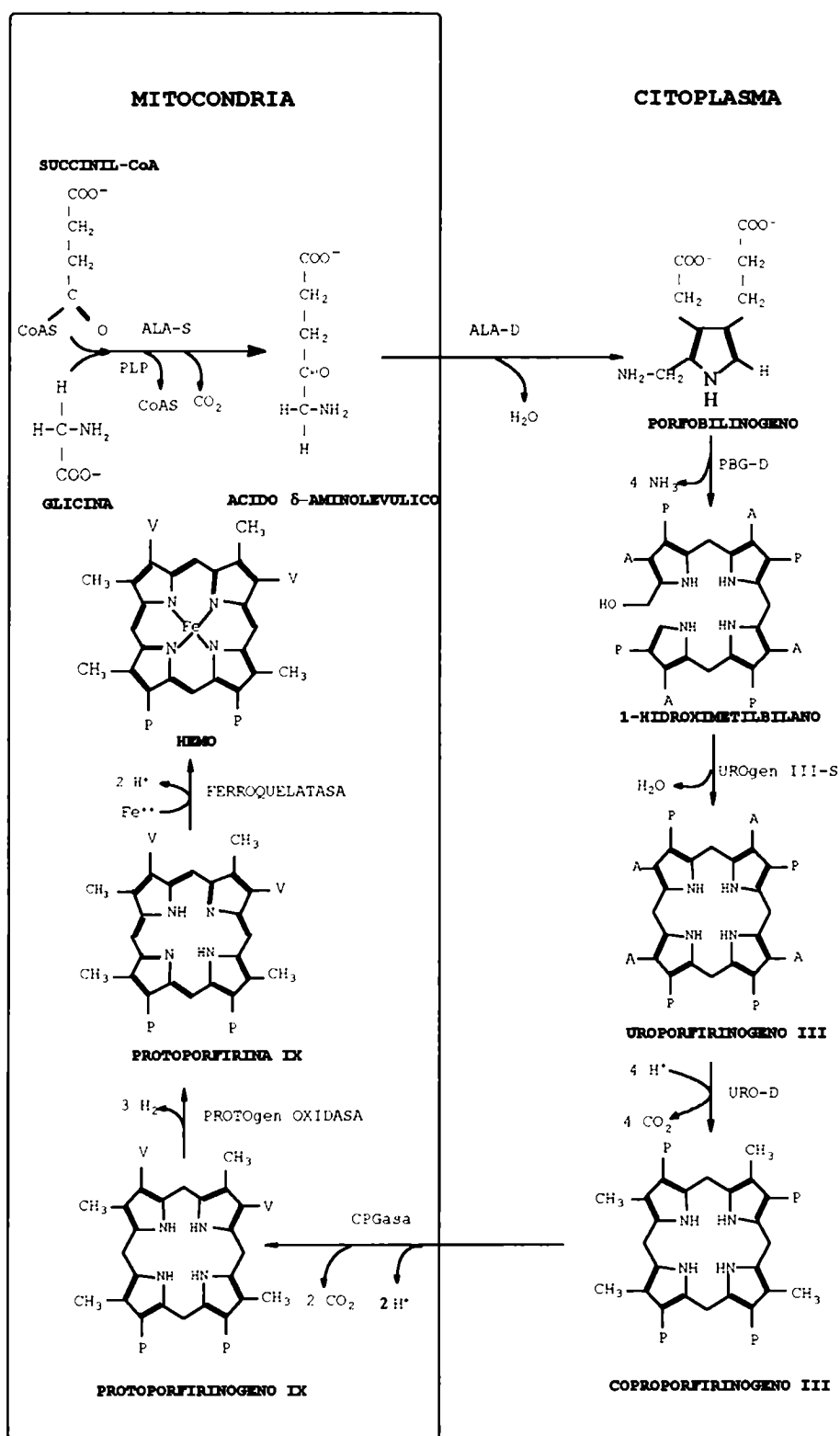


Figura I-I.2: Camino metabólico del hemo.

La acción del AIA sobre la actividad del ALA-S de mitocondrias renales y de hepatocitos es similar (Hayashi *et al.*, 1969; Gidari & Levere, 1977). Este proceso se caracteriza por un aumento inicial en la actividad de la enzima en el citosol, que más tarde se incorpora a la matriz mitocondrial (Barnes *et al.*, 1971). El mecanismo de inducción se caracteriza en el riñón por poseer una fase lag de 12 horas, mientras que en el hígado la respuesta es mucho más rápida (Woods, 1988). Estas observaciones sugieren que en la inducción del ALA-S hepática y renal operan mecanismos semejantes, pero la etapa de iniciación de este proceso en el riñón es más lenta.

El ALA-S es muy difícil de purificar ya que se encuentra en cantidades mínimas y es muy inestable. El peso molecular varía según el método de purificación y la fuente enzimática utilizada. Esta enzima es altamente específica para la succinil-CoA y requiere fosfato de piridoxal como cofactor. Los reactivos de grupos sulfhidrilos, tales como N-etilmaleimida, inhiben el ALA-S purificada de *Rhodopseudomonas spheroides* y este efecto es parcialmente revertido por incubación de la misma con β -mercaptoetanol, sugiriendo la presencia de grupos sulfhidrilos esenciales para su actividad.

La vida media del ALA-S es muy corta: 34 minutos en hígado de fetos de ratas (Woods, 1975), 70 minutos en hígado de rata adulta (Marver *et al.*, 1966b) y 160 minutos en hepatocitos de embriones de pollo (Sassa & Granick, 1970). Debido a su corta vida media se considera que la modulación de la síntesis de esta enzima es el principal mecanismo de regulación de la biosíntesis hepática del hemo (Batlle y Magnin, 1988).

Los posibles mecanismos de acción del ALA-S se discutieron extensamente. Actualmente el más aceptado es el que se esquematiza en la Figura I-1.3 (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 mediante un átomo de nitrógeno del anillo pirimidínico y una base de Schiff que se forma 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 -cetoadípico (III). Durante esta última conversión el protón H_R unido a la proteína se intercambia con un protón H_M proveniente del medio. A continuación el ácido α -amino- β -cetoadípico se decarboxila, 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 (Figura I-I.4). Se ha demostrado la transaminación de DOVA a ALA en varias 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).

I.4.2 Biosíntesis de porfobilinógeno (PBG)

La segunda enzima del camino biosintético de las porfirinas es la δ -aminolevúlico dehidrasa (ALA-D). Esta proteína cataliza la condensación asimétrica de dos moléculas de ALA para dar una molécula del monopirrol porfobilinógeno (PBG), primer precursor aromático de todas las porfirinas, con pérdida de una molécula de agua. Detectada en una gran cantidad de sistemas biológicos, se aisló, purificó y caracterizó a partir de fuentes bacterianas, vegetales y animales y se la obtuvo cristalizada de hígado bovino (Shemin, 1976). El ALA-D es una enzima citosólica, esto implica que el ALA sintetizado *in vivo* debe atravesar la membrana de la mitocondria para poder ser convertido en PBG.

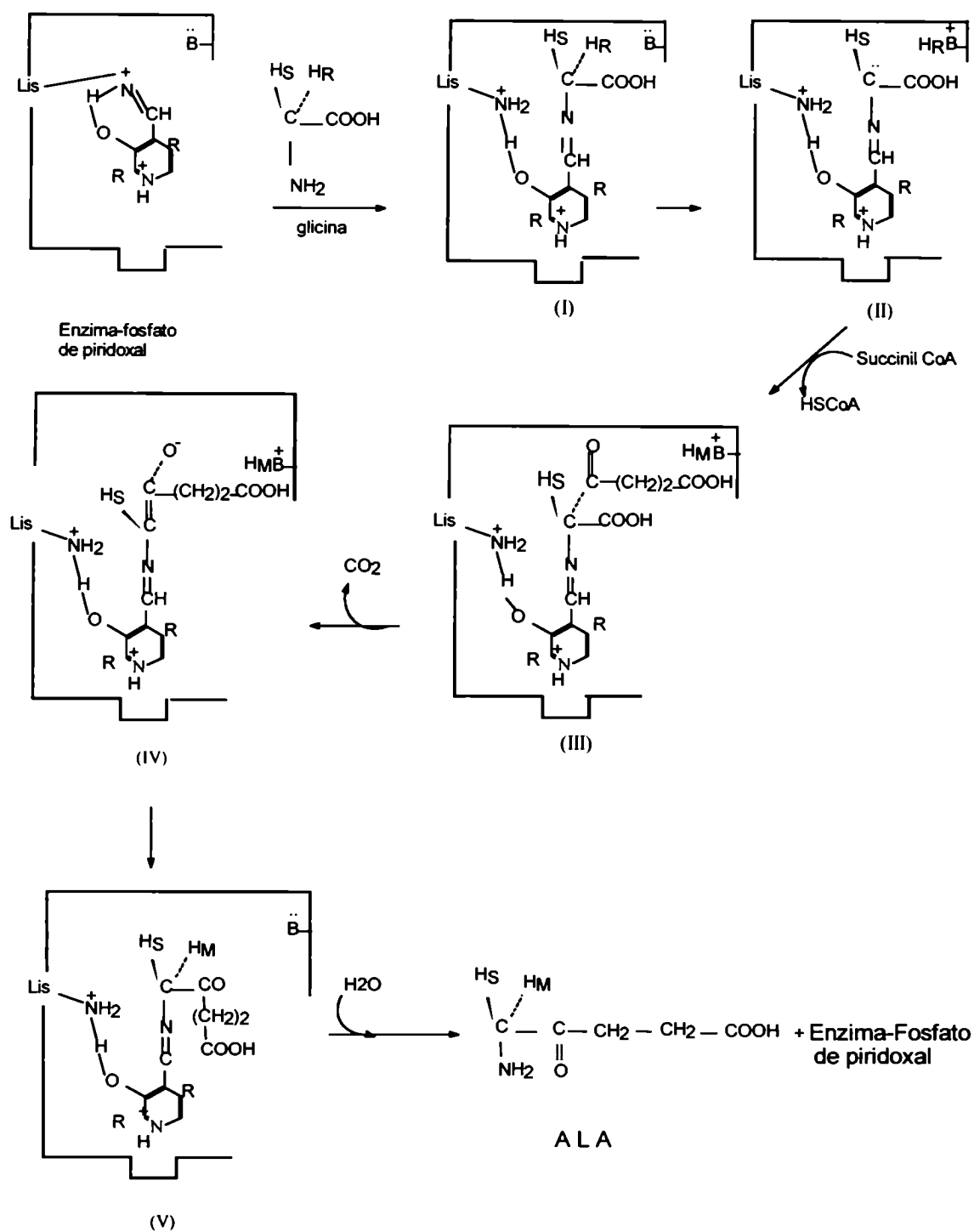


Figura I-I.3: Mecanismo propuesto para la formación del ALA por la vía del ALA-S. Las reacciones se describen detalladamente en el texto. R: $-\text{CH}_3$; R': $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{PO}_3\text{H}_2$.

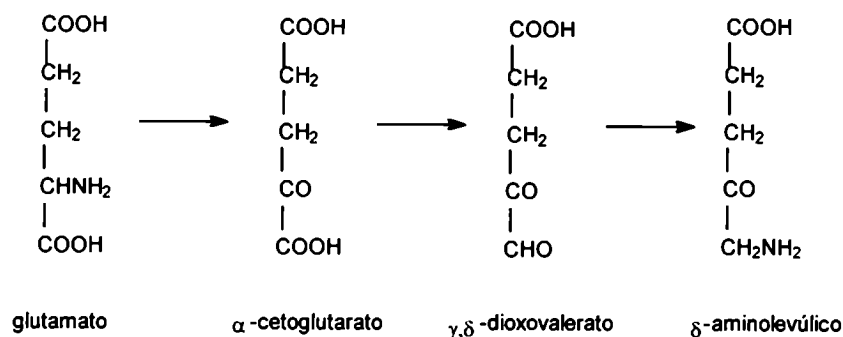


Figura I-I.4: Ruta alternativa para la formación de ALA, a partir de glutamato o α-cetoglutarato a partir de γ-δ- dioxovalerato.

Es una proteína homooctamérica con subunidades de 35 kDa. Dependiendo de las condiciones experimentales 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. Cuando se la purifica en presencia de Zn^{++} 10 μM , el ALA-D de mamíferos contiene ocho Zn^{++} por octámero (Tsukamoto *et al.*, 1979; Bevan *et al.*, 1980). En ausencia de Zn^{++} la proteína es catalíticamente inactiva, pero su estructura cuaternaria permanece intacta (Jaffe *et al.*, 1980). Para expresar su máxima actividad cada octámero requiere la presencia de cuatro iones Zn^{++} , éstos se denominan Zn catalíticos (Bevan *et al.*, 1980; Jaffe *et al.*, 1984). Cada octámero contiene adicionalmente otros cuatro iones Zn^{++} denominados estructurales o no catalíticos. En presencia de β-mercaptoetanol, el ALA-D de mamíferos puede expresar su máxima actividad sin requerir Zn^{++} no catalítico. Sin embargo en ausencia de β-mercaptoetanol y de Zn^{++} exógeno tiene lugar una inactivación reversible por formación de puentes disulfuro. Se sugirió que uno de los papeles que pueden desempeñar los iones Zn^{++} no catalíticos es prevenir la formación de puentes disulfuro entre grupos sulfhidrilo catalíticamente esenciales (Tsukamoto *et al.*, 1979). Un Zn^{++} que cumple esta función, si

bien no está directamente involucrado en la catálisis, necesariamente debe estar ubicado cerca del sitio activo (Jaffe, 1993). Cada sitio activo contiene dos sitios de unión para el sustrato.

Si bien las moléculas de ALA son idénticas, se las diferencia en ALA-A y en ALA-P según su ubicación final en la molécula de PBG. Mientras que el ALA-P proporciona el resto propiónico, el ALA-A aporta el resto acético (Figura I-I.5). La formación de la base de Schiff tiene lugar entre el C-4 del ALA-P y una lisina 252 del sitio activo (Jaffe *et al.*, 1992). Se han determinado la esteoquímica y estados de protonación de este intermediario (Jaffe, 1993). Se propuso que la formación de la segunda base de Schiff tiene lugar entre el N del ALA-P y el C-4 del ALA-A.

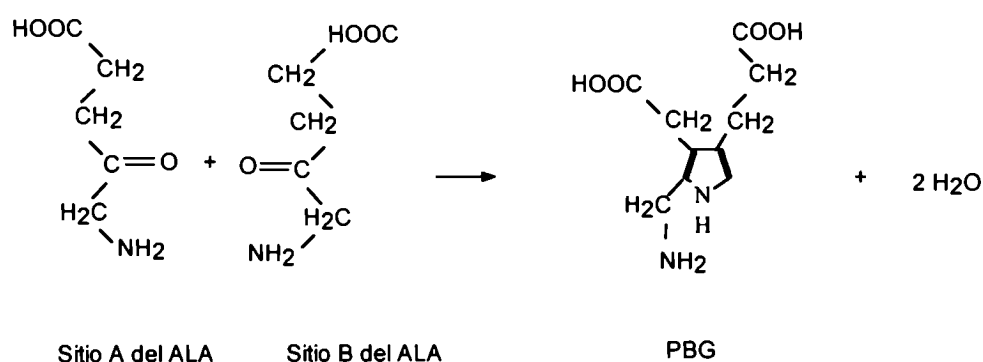


Figura I-I.5: Condensación asimétrica de dos moléculas de ALA

En nuestro laboratorio se ha propuesto un mecanismo para la síntesis de PBG que incorporó al esquema inicialmente postulado por Nandi y Shemin (1968), algunas características importantes como la ya nombrada existencia de un dímero funcional mínimo y de regiones definidas involucradas en la interacción de las subunidades, así como el papel que desempeñan los residuos histidina en el transporte de protones desde el medio acuoso al sitio activo hidrofóbico. La síntesis de PBG (Figura I-I.6) (Batlle & Stella, 1978) involucra las siguientes etapas:

Etapa 1: La primer molécula de ALA se une covalentemente a la enzima por medio de una base de Schiff que se establece entre el grupo ξ -amino del residuo lisina de la subunidad A y el grupo ceto del ALA I.

Etapa 2: por medio de una condensación aldólica, el carbanión resultante se une a la segunda molécula de sustrato (II), ésta a su vez interactúa mediante enlaces no covalentes con residuos positivos y negativos de la subunidad B y de esta manera le permite adoptar la conformación adecuada para que esta condensación tenga lugar.

Etapa 3: se produce la protonación del nitrógeno del grupo ξ -amino del residuo lisina y la eliminación de una molécula de agua.

Etapa 4: se transfiere un protón desde el grupo amino del ALA II al grupo N- ξ -amino de la lisina de la subunidad I.

Etapa 5: tiene lugar una reacción de transaminación entre la enzima y el producto, que luego de un reordenamiento final de cargas conduce a la estructura definitiva del PBG.

Hay evidencias que en el sitio catalítico del ALA-D existen, además de los residuos cisteína y lisina (Dent *et al.*, 1990), dos restos de histidina. En nuestro laboratorio se demostró la presencia de un residuo histidina esencial para la actividad en el ALA-D de hígado porcino. El ALA, Zn^{++} y esa histidina se encuentran muy próximos unos a otros en el sitio activo (Fukuda *et al.*, 1988).

En la mayoría de las fuentes estudiadas, la actividad del ALA-D es mucho más alta que la del ALA-S. Investigaciones realizadas con tejidos renales provenientes de distintas especies de mamíferos, revelan que en el riñón la actividad específica del ALA-D excede de 10 a 100 veces la del ALA-S (Woods, 1988).

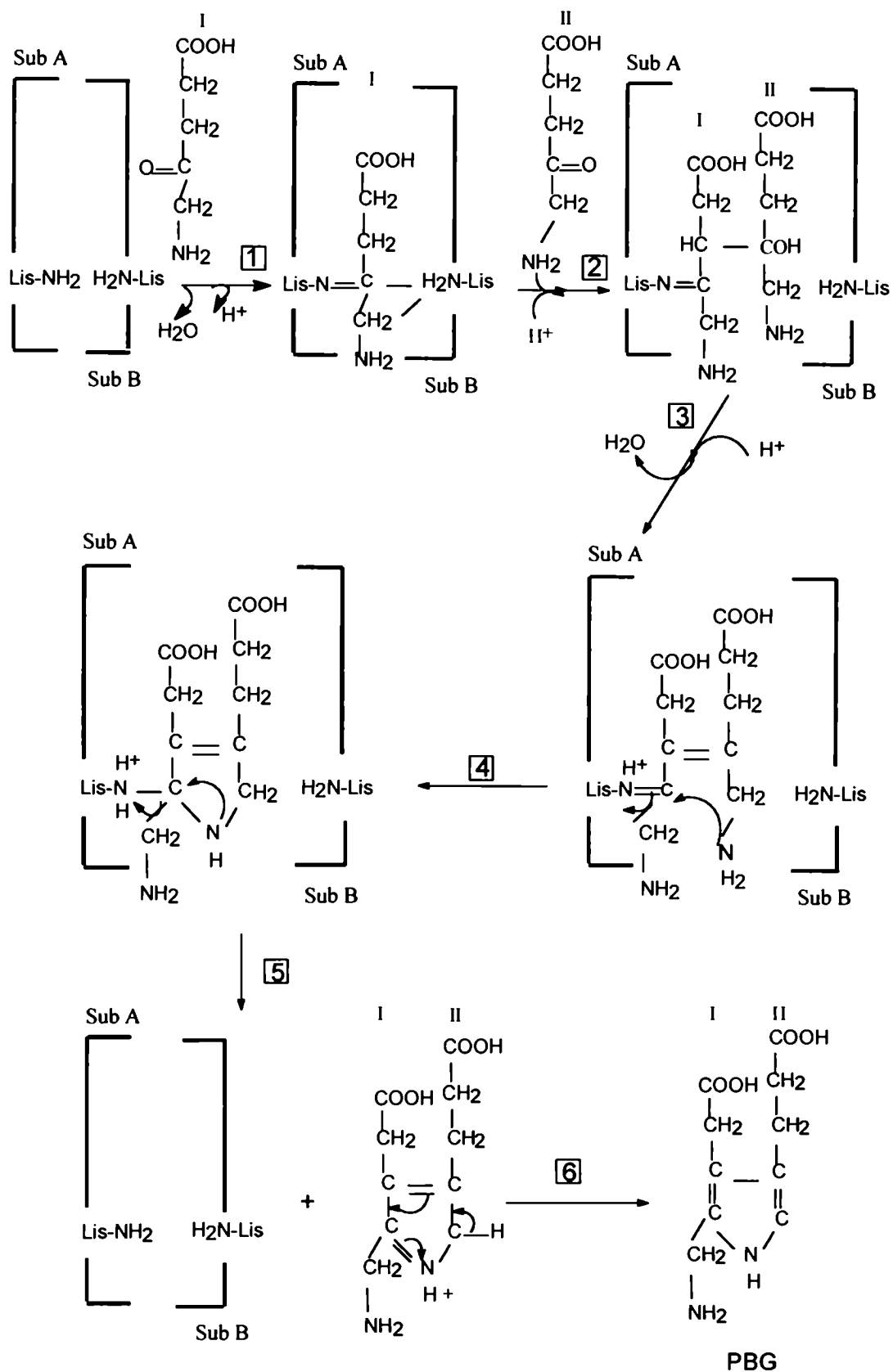


Figura I-I.6: Esquema para el mecanismo de acción de la síntesis de PBG basándose en la existencia de un dímero funcional mínimo formado por las subunidades A y B.

El ALA-D es termoestable y el Cd puede mimetizar el efecto protector atribuido al Zn^{++} (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.

Tanto el plomo como el indio son inhibidores del ALA-D renal *in vivo* (Woods *et al.*, 1984). Este efecto tiene curiosamente poca repercusión en la capacidad de las células renales en biosintetizar hemo. Esta observación indicaría que la inhibición no sería suficiente como para alterar este camino metabólico. Alternativamente podría significar que el pool de hemo en las células del túbulo proximal es abundante. Así, habría disponibilidad de este metabolito a corto plazo para la síntesis de hemoproteínas esenciales (Woods & Fowler, 1982).

Oskarsson & Fowler (1987) observaron una respuesta adaptativa del riñón a la intoxicación con hidróxido de metilmercurio. Este comportamiento refleja una mayor síntesis de metalotioneínas u otras proteínas capaces de ligar metales en este órgano.

I.4.3 Formación de uroporfirinógenos

Este sistema enzimático citoplasmático cataliza la condensación de cuatro moléculas de PBG para dar el primer tetrapirrol de este camino biosintético, el uroporfirinógeno.

La PBG-asa es un complejo enzimático constituido por dos enzimas. La hidroximetilbilano sintetasa (HMS), también llamada PBG-deaminasa (PBG-D) o Uroporfirinógeno I Sintetasa (URO I-S) y la Uroporfirinógeno III sintetasa (URO III-S) también llamada cosintetasa o isomerasa.

Las características, propiedades y mecanismo de acción de estas enzimas serán descriptos detalladamente en un capítulo aparte.

1.4.4 Decarboxilación de uroporfirinógenos

La enzima citosólica uroporfirinógeno decarboxilasa (URO-D) cataliza la liberación secuencial de los cuatro grupos carboxilos de las cadenas laterales de acetato presentes en los uroporfirinógenos para dar los correspondientes coproporfirinógenos (COPROgen) (Granick & Mauzerall, 1958). La URO-D decarboxila los porfirinógenos pero no puede actuar sobre las correspondientes porfirinas, así se explica que su incubación se realice en anaerobiosis.

La detección de intermediarios de 7, 6 y 5 carboxilos durante la reacción (Batlle & Grinstein, 1964 a,b; San Martín de Viale & Grinstein, 1968), sugirió que este proceso se lleva a cabo en etapas. Se estableció que el mismo ocurre de manera secuencial, comenzando por el anillo D y siguiendo en el sentido de las agujas del reloj, por los anillos A, B y C (Cornford , 1964; Smith & Francis 1979).

La URO-D puede actuar sobre cualquiera de los cuatro isómeros del uroporfirinógeno, pero lo hace con distinta velocidad. El Uroporfirinógeno III se decarboxila con mayor velocidad, siguiéndole en orden decreciente los tipo IV, II y I (Smith & Francis, 1979). Se demostró que una sola proteína cataliza esta reacción, pero aún no se ha podido establecer si las cuatro decarboxilaciones tienen lugar en un mismo sitio activo o en cuatro diferentes. Este proceso ocurre en dos etapas: una rápida y una lenta. La etapa inicial, rápida, involucra la decarboxilación del anillo D del uroporfirinógeno, seguida de una más lenta 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.

Esta enzima se estudió en numerosas fuentes tales como eritrocitos de conejo (Mauzerall & Granick, 1958), bacterias (Koopman *et al.*, 1986), hígado y eritrocitos humanos (Afonso *et al.*, 1985), *Euglena gracilis* (Juknat *et al.*, 1989), adenocarcinoma mamario de ratón (Navone *et al.*, 1992).

La URO-D tiene una vida media larga, es termolábil y sulfhidrúlica (Smith & Francis, 1981) por lo tanto los metales pesados y los bloqueantes de grupos sulfhidrilos son inhibidores; mientras que el β -mercaptoetanol y el glutatión reducido protegen su actividad.

Estudios realizados con la URO-D de eritrocitos humanos (De Verneuil *et al.*, 1983) y de aves (Kawanishi *et al.*, 1983) demuestran la existencia de 11 y 12 residuos histidina por mol de enzima nativa. Trabajando con esta enzima de *Rp. palustris* se concluyó que una cisteína, uno o dos residuos histidina y posiblemente un grupo lisina estarían involucrados en el mecanismo de reacción (Koopmann & Batlle, 1987).

De todas las enzimas del camino metabólico del hemo, la URO-D es la que más ampliamente se estudió en el riñón y se encontró que difiere en varios aspectos de la URO-D de hígado. La actividad específica de la enzima renal es aproximadamente tres veces menor que la hepática (Woods *et al.*, 1984). En incubaciones llevadas a cabo con la URO-D de riñón, se acumulan los intermediarios de 7, 6 y 5 grupos carboxilo en mayor proporción respecto a las mediciones hechas con la enzima hepática en iguales condiciones. La presencia de glutatión reducido (GSH) en el sistema de incubación de la URO-D renal afecta notoriamente la concentración de estos intermediarios. Así en ausencia de GSH, utilizando uroporfirinógeno III ó uroporfirinógeno I como sustrato (5 μ M) las porfirinas hepta- y tetracarboxiladas constituyen aproximadamente el 30% del producto formado. En presencia de GSH 10 mM la síntesis de porfirinas tetracarboxiladas aumenta hasta representar el 60% del producto formado, mientras que la acumulación de la heptacarboxilada disminuye por debajo del 10%.

Aparentemente el efecto del GSH en la enzima renal estaría localizado preferentemente en el sitio de decarboxilación de los porfirinógenos hepta y hexa carboxilados, este sitio es también el más susceptible a la inhibición por metales divalentes, tales como el Hg^{++} (Woods *et al.*, 1984; Woods & Fowler, 1987). La acción estimuladora del GSH sugiere que la URO-D renal podría ser una enzima regulatoria durante la exposición a metales o a otras sustancias que puedan modular los niveles de GSH tisular (Barnes *et al.*, 1971).

I.4.5 Síntesis de protoporfirinógeno IX

La Coproporfirinógeno Oxidasa (CPG-asa) es una enzima mitocondrial que convierte únicamente al isómero III del coproporfirinógeno (COPROgen) en protoporfirinógeno IX (PROTOgen IX). Este compuesto se forma merced a la conversión de los restos propiónicos, ubicados en los anillos A y B, en restos vinilo por medio de una decarboxilación oxidativa (Granick & Mauzerall, 1958).

Esta enzima ha sido detectada en una gran variedad de fuentes, tales como hígado de rata (Batlle *et al.*, 1965), linfocitos humanos (Grandchamp & Nordmann, 1977), bazo de rata (Kardish & Woods, 1980), hígado bovino (Yoshinaga & Sano, 1980), *Saccharomyces cerevisiae* (Camadro *et al.*, 1986). En todas las células estudiadas la CPG-asa está débilmente unida a la membrana interna de la mitocondria en el espacio intermembranas (Greenawalt, 1974) y no se afecta por la presencia de agentes quelantes (Yoshinaga & Sano, 1980). En eucariotes tiene un requerimiento absoluto por el oxígeno molecular; es además altamente específica por el coproporfirinógeno III, único sustrato capaz de producir la protoporfirina IX, que es a su vez el único isómero que se encuentra en las células vivientes.

En organismos aeróbicos el aceptor de electrones es el oxígeno molecular (Batlle *et al.*, 1965). Dado que en condiciones anaeróbicas también es factible la formación de protoporfirina, se pensó entonces que en este caso debía funcionar otro aceptor de

electrones distinto del oxígeno. Se ha propuesto que este aceptor estaría constituido por ATP, L-metionina y Mg^{++} . Se comprobó que la CPG-asa anaeróbica es funcional en diversos organismos tales como *Pseudomonas* (Ehteshamuddin, 1968), *Rp. spheroides* (Tait, 1972), *Chromatium* (Tait, 1972) y levadura (Poulson & Poglase, 1974).

El peso molecular de la CPG-asa de diversas fuentes parece coincidir en 80 kDa (Batlle *et al.*, 1965; Yoshinaga & Sano, 1980). Sin embargo para levadura se ha informado un valor de 70 kDa (Poulson & Poglase, 1974) y la existencia de una única cadena polipéptica con subunidades de peso molecular 35 kDa, así se postuló que la CPG-asa nativa sería un dímero de dos subunidades idénticas (Camadro *et al.*, 1986).

Los reactivos de grupos tiólicos inhiben la actividad de la CPG-asa, indicando así la presencia de restos sulfhidrúlicos en su sitio activo (Batlle *et al.*, 1965; Camadro *et al.*, 1986).

Se propuso que la decarboxilación oxidativa de los restos propionato se produce en etapas; el proceso comenzaría por el anillo A siguiendo, como en el caso de la URO-D con el anillo B, en el sentido de las agujas del reloj. En el esquema propuesto (Batlle & Rimington, 1965; Tait, 1968) las cadenas de ácido propiónico se convierten en ácido β -hidroxipropiónico, luego por deshidratación se produce un acril derivado que por decarboxilación da origen al sustituyente vinilo (Figura I-I.7). Posteriormente se demostró la presencia de un residuo tirosina en el sitio activo, el cual tendría un papel importante en la reacción de oxidación de las cadenas laterales (Yoshinaga & Sano, 1980).

I.4.6 Oxidación de protoporfirinógeno IX a protoporfirina IX

La enzima protoporfirinógeno oxidasa (PTG-asa) cataliza la oxidación del PROTOgen IX a protoporfirina IX (PROTO IX), con pérdida de seis átomos de hidrógeno.

La PTG-asa actúa específicamente sobre su sustrato (PROTOgen IX) pero no sobre otros porfirinógenos. Su localización es mitocondrial y se detectó en *Saccharomyces cerevisiae* (Poulson & Poglase, 1975), *Escherichia coli* (Jacobs & Jacobs, 1975), *Rp. spheroides* (Jacobs & Jacobs, 1981), hígado de rata (Poulson, 1976) y en otras fuentes (Jacobs & Jacobs, 1979; Deybach *et al.*, 1985).

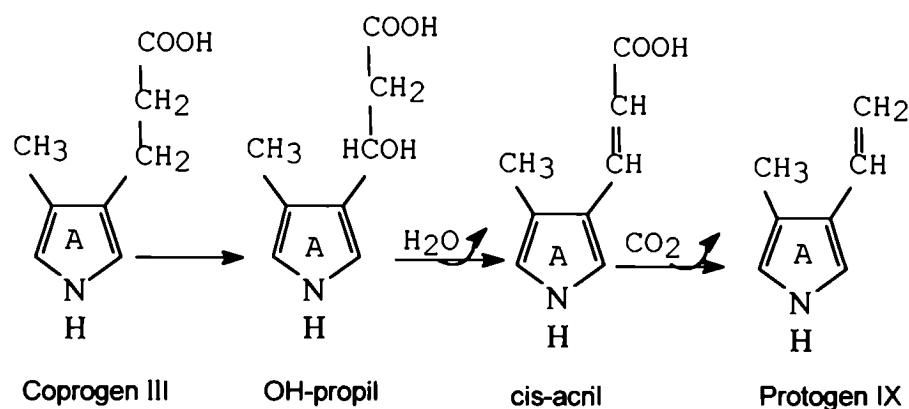


Figura I-I.7: Decarboxilación oxidativa del coproporfirinógeno III a protoporfirinógeno IX.

Si bien en la mayoría de los casos su actividad es dependiente de oxígeno, se demostró que en *E. coli* el fumarato (Jacobs & Jacobs, 1975), nitrato (Jacobs & Jacobs, 1976) y las quinonas (Jacobs & Jacobs, 1978) actúan en condiciones anaeróbicas como aceptores de electrones.

El peso molecular de esta enzima varía desde 35 kDa (Poulson, 1976) hasta 180 kDa (Poulson & Poglase, 1975). Si bien no se ha encontrado que requiera cofactores, los agentes reductores de grupos tiólicos estimulan su actividad (Poulson, 1976).

Su mecanismo de acción aún no ha sido dilucidado, sin embargo, se postula que en el sitio activo se encontrarían residuos sulfhidrúlicos que serían importantes para la unión con el sustrato a través de sus grupos vinilo. Se ha demostrado también que la reacción es estereoespecífica y tiene lugar solamente sobre un lado del anillo porfirínico (Jackson & Games, 1975).

I.4.7 Obtención de hierro-protoporfirina IX

El paso final en la biosíntesis del hemo es la introducción de un átomo de hierro (Fe^{++}) en la molécula de PROTO IX. La enzima encargada de catalizar esta reacción es la ferroquelatasa, denominada también hemosintetasa o protohemoferroliasa.

Esta enzima se estudió en una gran variedad de tejidos, por ejemplo en *Saccharomyces cerevisiae* (Porra & Jones, 1963), hígado de rata (Porra & Jones, 1963; Taketani & Tokinaga, 1981), de cerdo (Jones & Jones, 1969) y humano (Camadro *et al.*, 1984), eritrocitos de ave (Hanson & Dailey, 1984), *Rp. spheroides* (Dailey *et al.*, 1986), *Tripanosoma cruzi* (Salzman & Batlle, 1986).

La ferroquelatasa se encuentra asociada a la membrana interna de la mitocondria (Mc Kay *et al.*, 1969). Esta es una enzima sulfhidrúlica, por ello es sensible al efecto inhibitorio de ciertos metales divalentes, por ejemplo el Pb, Mg y Mn (Taketani & Tokinaga, 1981; Dailey & Fleming, 1983; Salzman & Batlle, 1986). El Co no afecta su actividad y cuando el Cu actúa en presencia de Fe se convierte en un fuerte inhibidor (Dailey & Fleming, 1983; Salzman & Batlle, 1986). El glutatión aumenta su actividad.

Puede utilizar como sustrato a otras porfirinas dicarboxílicas (Porra & Jones, 1963; Jones & Jones, 1969) y a otros metales divalentes como Co^{++} y Zn^{++} (Johnson & Jones, 1964), pero es destacable su alta especificidad por el hierro dado que *in vivo* debe seleccionar este metal frente a una gran cantidad de cationes divalentes. Además de su especificidad por la PROTO IX, se comprobó que la meso- y la deuterio-porfirina actúan como sustratos *in vitro*. Sin embargo, en la célula sólo se encuentra disponible la protoporfirina y por lo tanto no se forman otros hemo-derivados. Si bien aún no se ha demostrado inequívocamente la existencia de cofactores, se ha propuesto que el fosfato de piridoxal participaría en esta reacción, aunque se desconoce su mecanismo (Labbe, 1976).

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

Se ha postulado la presencia de residuos arginina (Dailey *et al.*, 1986) y triptofano (Dailey, 1987) en el sitio activo. Las argininas estarían involucradas en la unión del sustrato porfirina, posiblemente a través de una interacción iónica entre el residuo del aminoácido y la cadena sustituyente de ácido propiónico. Se ha sugerido para esta enzima la existencia de dos sitios activos, uno para el metal y otro para la porfirina, adjudicándole al último un modelo de bolsillo hidrofóbico dado el gran porcentaje (48%) de aminoácidos de esta naturaleza detectados en esta región (Taketani & Tokynaga, 1981; Dailey *et al.*, 1989).

La administración de drogas, cuyas estructuras presentan cadenas laterales insaturadas, produce la acumulación hepática de pigmentos que inhiben la actividad de la ferroquelatasa (De Matteis & Gibbs, 1975, 1980). Estos pigmentos resultaron ser porfirinas modificadas con sustituyentes en uno de los nitrógenos pirrólicos. El comportamiento de los mismos depende de la naturaleza y del tamaño de esos sustituyentes. Si son pequeños, su presencia dificulta la incorporación de metales divalentes, impidiendo así que la porfirina modificada actúe como sustrato de la ferroquelatasa. Cuando el sustituyente es grande, el pigmento no puede unirse a la enzima por impedimento estérico y de esta forma no se modifica la actividad (De Matteis & Gibbs, 1980). La griseofulvina es un antimicótico que se emplea como inductor de porfiria experimental en ratones. Cualquiera sea la vía de administración de griseofulvina, se produce inhibición de ferroquelatasa en hígado y en piel. Se han propuesto mecanismos para explicar la formación de porfirinas modificadas por acción de esta droga (Afonso *et al.*, 1987; Vazquez *et al.*, 1987).

I.5. Bibliografía

- Afonso S., Chinarro Familiar S., Stella A., Batlle A., Lenczner J. y Magnin P. (1985) Uroporfirinógeno decarboxilasa eritrocitaria y hepática en porfiria cutánea tardía. *Rev. Arg. Dermat.* **66**: 12-16.
- Afonso S., Buzaleh A., Navone N., Polo C., Schoua E., Vazquez E. y Batlle A. (1987) Acerca de la fototoxicidad de la griseofulvina. Posibles mecanismos de acción empleando cultivos de explantes tisulares. *Rev. Arg de Dermat.* **68**: 303-310.
- Akhtar M., Abboud M., Barnard G., Jordan P. & Zaman Z. (1976) Mechanism and stereochemistry of enzymic reactions involved in porphyrin biosynthesis. *Phil. Trans. R. Soc., Lond. (Biol.)*, B **173**: 117-136.
- Barnes M., Jones M. & Jones O. (1971) Ferrochelatase and δ -aminolaevulate synthetase in brain, heart, kidney and liver of normal and porphyric rats. *Biochem. J.* **124**: 633-637.
- Batlle A. & Grinstein M. (1964a) Porphyrin biosynthesis I. Studies on erythrocytes preparations. *Biochim. Biophys. Acta* **82**: 1-12.
- Batlle A. & Grinstein M. (1964b). Porphyrin biosynthesis II Phylloerythrinogen III, a normal intermediate in the biosynthesis of protoporphyrin IX. *Biochim Biophys. Acta* **82**: 13-20.
- Batlle A. y Magnin P. (1988) Porfirinas y Porfirias. Aspectos Clínicos y Bioquímicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Suplemento Nro 2*.
- Batlle A. & Rimington C. (1965) Estudios sobre la síntesis de la diacrílico deuteroporfirina IX, un posible intermediario en la biosíntesis de protoporfirina IX. *Ciencia e Inv.* **22**: 369-373.
- Batlle A. & Stella A. (1978) Aminolaevulinate dehydratase. Its mechanism of action. *Int. J. Biochem.* **9**: 861-864.
- Batlle A., Benson A. & Rimington C. (1965) Purification and properties of coproporphyrinogenase. *Biochem.J.* **97**: 731-740.
- Beale S. & Castelfranco P. (1974) The biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in high plants. II. Formation of ^{14}C - δ -aminolevulinic acid from labeled precursors in greening plants tissue. *Plant Physiol.* **53**: 297-303.
- Bevan D., Bodlaender P. & Shemin D. (1980) Mechanism of porphobilinogen synthase: requirement of Zn^{++} for enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **255**: 2030- 2035.
- Bugany H, Flothe L & Weser U. (1971) Kinetics of metal chelatase of rat liver mitochondria. *FEBS Lett* **13**: 92-95.
- Camadro J., Abraham N. & Levere R. (1984) Kinetic studies of human liver ferrochelatase. *J. Biol. Chem.* **259**: 5678-5682.

- Camadro J., Chambow H., Jolles J. & Labbe P. (1986) Purification and properties of coproporphyrinogen oxidase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **156**: 579-587.
- Cornford P. (1964) Transformation of porphobilinogen into porphyrins by preparations from human erythrocytes. *Biochem. J.* **91**: 64-69.
- Dailey H. (1987) Spectrometric examination of the active site of bovine ferrochelatase. *Biochem., USA* **24**: 1287-1294.
- Dailey H. & Fleming J. (1983) Bovine Ferrochelatase Kinetics analysis of inhibition by N-methylproto, manganese and haem. *J. Biol. Chem.* **258**: 11453-11459.
- Dailey H., Fleming J. & Harbin B. (1986) Ferrochelatase from *Rp. sphaeroides*: Substrate specificity and role of sulfhydryl and arginyl residues. *J. Bacteriol.* **165**: 1-5.
- Dailey H., Jones C. & Karr S. (1989) Interaction of free porphyrins and metalloporphyrins with mouse ferrochelatase. A model for the active site of ferrochelatase. *Biochim. Biophys. Acta* **999**: 7-11.
- De Matteis F. & Gibbs A. (1975) Stimulation of the pathway of porphyrin synthesis in the liver of rats and mice with griseofulvin, 3-5 diethoxycarbonyl-1,4-dihydrocollidine and related drugs: Evidence for two basically different mechanisms. *Biochem. J.* **146**: 285-289.
- De Matteis F. & Gibbs A. (1980) Drug induced conversion of liver haem into modified porphyrins. Evidence for two classes of products. *Biochem J.* **187**: 285-290.
- Dent A., Beyersmann C., Block C. & Hasnain S. (1990) Two different Zinc sites in bovine 5-aminolevulinate dehydratase distinguished by extended X-ray absorption fine structure. *Biochemistry* **29**: 7822-7828.
- De Verneuil H., Sassa S. & Kappas A. (1983) Purification and properties of uroporphyrinogen decarboxylase from human erythrocytes. A single enzyme catalyzing the four sequential decarboxylations of uroporphyrinogen I and III. *J. Biol. Chem.* **258**: 2454-2460.
- Deybach J., Da Silva V, Grandchamp B & Nordmann Y. (1985) The mitochondrial localization of Protoporphyrinogen oxidase. *Eur. J. Biochem.* **149**: 431-435.
- Ehteshamuddin A. (1968) Anaerobic formation of Protoporphyrin IX from Coproporphyrinogen III by bacterial preparations. *Biochem. J.* **107**: 446-447.
- Eiseman J & Alvarez A. (1978) Alterations induced in heme pathway enzymes and monooxygenases by gold. *Molec. Pharmacol.* **14**: 1176-1183.
- Elder G. & Tovey J. (1977) Uroporphyrinogen decarboxylase activity of human tissues. *Biochem Soc Trans* **5**: 1470-1475.
- Fischer H. & Orth H. (1968) Die Chemie des Pyrrols I (1934); II 1 (1937); II, 2 (1940) Akadem. Verlagsgesellschaft, Leipzig. Ann Arbor Univ. Press 1946 and Johnson Reprint Corp., New York.

Fowler B. & Goering P. (1986) Mechanisms of gallium arsenide (GaAs) inhibition by δ -aminolevulinic acid dehydratase. *Pharmacologist* **28**: 229-232.

Fowler B., Kimmel C. & Woods J. (1980) 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.

Fukuda H., Paredes S. & Batlle A. (1988) Active site histidine in pig liver aminolevulinic acid dehydratase modified by diethyl pyrocarbonate and protected by Zn^{++} ions. *Comp. Biochem. Physiol.* **91 B**: 285-291.

Gibson R. & Goldberg A. (1970) Defects in heme synthesis in mammalian tissues in experimental lead poisoning and experimental porphyria. *Clin Sci* **38**: 63-72.

Gibson R., Neuberger A. & Scott J. (1955) The purification and properties of δ -aminolaevulinic acid dehydrase. *Biochem J.* **61**: 618-629.

Gidari A. & Levere R. (1977) Enzymatic formation and cellular regulation of heme biosynthesis. *Semin. Hematol.* **14**: 145-168.

Grandchamp B. & Nordman Y. (1977) Decreased lymphocyte coproporphyrinogen III oxidase activity in hereditary coproporphyria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **74**: 1089-1095.

Granick S., (1966) The induction *in vitro* of the synthesis of δ -aminolevulinic acid synthetase in chemical porphyria: a response to certain drugs, sex hormones and foreign chemicals. *J. Biol. Chem.* **241**: 1359-1364.

Granick S. & Mauzerall D. (1958) Enzymes of porphyrin synthesis in red blood cells. *Ann New York Acad Sci.* **75**: 1155-1158.

Granick S. & Urata G. (1963) Increase in activity of δ -aminolevulinic acid synthetase in liver mitochondria induced by feeding of 3,5-dicarbethoxy-1,4 dihydrocollidine. *J. Biol Chem.* **238**: 821-826.

Greenawalt J. (1974). The isolation of outer and inner mitochondrial membranes. *Methods of Enzymology* **31**: 310.

Hanson J. & Dailey H. (1984) Purification and characterization of chicken erythrocyte ferrochelatase. *J. Biol. Chem.* **222**: 695-700.

Hayashi N., Yoda B. & Kikuchi G. (1969) Mechanism of allylisopropyl acetamide induced increase of δ -aminolevulinate synthetase in liver mitochondria IV: Accumulation of the enzyme in the soluble fraction of rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **131**: 83-91.

Henderson J.& Toothill C. (1983) Urinary coproporphyrin in lead intoxication: a study in the rabbit. *Clin. Sci.* **65**: 527-532.

Jackson A. & Games D. (1975) The later stages of porphyrin biosynthesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci. N.Y.* **144**: 591-596.

Jacob K., Egeler E., Hennel B. & Lupp P. (1989) Coproporphyrin isomers II and IV are normal constituents of human urine. *J. Clin. Chem. Biochem.* **27**: 659-661.

Jacobs N. & Jacobs J. (1975) Fumarate as alternate electron acceptor for the late steps of anaerobic synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **65**: 435-441.

Jacobs N. & Jacobs J. (1976) Nitrate, fumarate and oxygen as electron acceptors for the late step of microbial heme synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **449**: 1-9.

Jacobs N. & Jacobs J. (1978) Quinones as hydrogen carriers for a late step in anaerobic heme biosynthesis in *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **544**: 540-546.

Jacobs N. & Jacobs J. (1979) Microbial oxidation of protoporphyrinogen, an intermediate in heme and chlorophyll biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **197**: 396-403.

Jacobs N. & Jacobs J. (1981) Protoporphyrinogen oxidation in *Rp. spheroides* a step in heme and bacteriochlorophyll biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **211**: 305-311.

Jaffe E. (1993) Predicting the Zn²⁺ ligands in metalloproteins. Case studied: Porphobilinogen synthase. *Comments Inorg. Chem.* **15**: 67-92.

Jaffe E., Salowe S., Chen N. & De Haven P. (1984) Porphobilinogen Synthase modification with methylmethanethiosulfonate. *J. Biol. Chem.* **259**: 5032-5036.

Jaffe E., Abrams W., Kaempfen K. & Harris K. (1992) 5-chlorolevulinate modification of porphobilinogen synthase identifies a potential role for the catalytic zinc. *Biochemistry* **31**: 2113-2123.

Johnson A. & Jones O. (1964) Enzymic formation of hemes and other metalloporphyrins. *Biochim. Biophys. Acta* **93**: 171-175.

Jones M. & Jones O. (1969) The structural organization of heme synthesis in rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **113**: 507-511.

Juknat A., Seubert A., Seubert S. & Ippen H. (1989) Studies on uroporphyrinogen decarboxylase of etiolated *Euglena gracilis* Z. *Eur. J. Biochem.* **179**: 423-428.

Kardish R. & Woods J. (1980) Measurement of Heme Biosynthetic Enzymes in mammalian tissues. *J. Appl. Biochem.* **2**: 159-167.

Kawanishi S., Seki Y. & Sano S. (1983) Uroporphyrinogen Decarboxylase. Purification, properties, and inhibition by polychlorinated biphenyl isomers. *J. Biol. Chem.* **258**: 4285-4292.

Kennedy G., Jackson A., Kennrer C. & Suckling S. (1970) Isolation structure and synthesis of a tricarboxylic porphyrin from the hardier glands of the rats. *FEBS Lett.* **6**: 9-12.

Kikuchi G., Kumar A., Talmage P. & Shemin D. (1958), The enzymic synthesis of δ -aminolevulinic acid. *J. Biol. Chem.* **233**: 1214-1219.

- Koopmann G. & Batlle A. (1987) 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.
- Koopmann G., Juknat A. & Batlle A. (1986) Porphyrin biosynthesis in *Rp. palustris* -V. Purification of uroporphyrinogen decarboxylase and some unusual properties. *Int. J. Biochem.* **18**: 935-944.
- Labbe R. (1976) Clinical biochemical interpretations of erythrocyte protoporphyrin. En Porphyrins in Human Diseases. Editorial M. Doss-Karger, Basilea.
- Lombardo E., Araujo L., Juknat A & Batlle A. (1988) Effect of illumination on growth, chlorophyll content and δ -ALA synthesis in *Euglena gracilis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **91B**: 279-284.
- Maines M. & Kappas A. (1977) 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.
- Maines M., Tomio M. & Janousek V (1978). Differential patterns of heme and porphyrins biosynthesis in liver and kidney: metal ion blockade of δ -aminolevulinic acid synthetase induction by porphyrinogenic agents. En *Diagnosis and Therapy of Porphyrrias and Lead Intoxication*. Doss M (ed.), New York, Springer Verlag, 8-14.
- Marver H., Tschudy D., Perlroth M. & Collins A. (1966a) δ -aminolevulinic acid synthetase. I. Studies in liver homogenate. *J. Biol. Chem.* **241**: 2803-2809.
- Marver H., Collins A., Tschudy D. & Recheigl M. (1966b) δ -aminolevulinic acid synthetase. II. Induction in rat liver. *J. Biol. Chem.* **241**: 4323-4328.
- Mauzerall D. & Granick S. (1958) Porphyrin biosynthesis in erythrocytes III. Uroporphyrinogen and its decarboxylase. *J. Biol. Chem.* **232**: 1141-1162.
- Mc Kay R., Druyan R., Getz G. & Rabinovitz M. (1969) Intramitochondrial localization of δ -aminolevulinic acid synthetase and ferrochelatase in rat liver. *Biochem. J* **114**: 455-460.
- Nandi D. & Shemin D. (1968) δ -aminolevulinic acid dehydratase of *Rh. spheroides* III. Mechanism of porphobilinogen synthesis. *J. Biol. Chem.* **243**: 1236-1242.
- Navone N., Afonso S., Polo C. & Batlle A. (1992) Uroporphyrinogen decarboxylase from mouse mammary carcinoma and liver of normal and tumor-bearing mice. *Comp. Biochem. Physiol. B* **102**: 87-92.
- Oskarsson A. & Fowler B. (1987) Alteration in renal heme biosynthesis during metal nephrotoxicity. *Ann NY Acad Sci.* **514**: 268-277.
- Patton G. & Beattie D. (1973) Studies on hepatic δ -aminolevulinic acid synthetase. *J. Biol. Chem.* **248**: 4467-4472.

Polo C., Frisardi A., Resnick E., Schoua A. & Batlle A. (1988) Factors influencing fluorescence spectra of free porphyrins. *Clin. Chem.* **34**: 757-764.

Porra R. & Jones O. (1963). Studies on ferrochelatase. An investigation of the role of ferrochelatase in the biosynthesis of various prosthetic groups. *Biochem J.* **87**: 186-191.

Porra R., Barnes R. & Jones O. (1972) The level and subcellular distribution of δ -aminolaevulinate synthase activity in semianaerobic and aerobic yeasts. Hoppe-Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **353**: 1365-1371.

Poulson R. (1976) The enzymic conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX in mammalian mitochondria. *J. Biol. Chem.* **251**: 3730-3733.

Poulson R. & Poglase W. (1974) Aerobic and anaerobic coproporphyrinogenase activity in extracts from *Saccharomyces cerevisiae*: Purification and characterization *J. Biol. Chem.* **249**: 6367-6371.

Poulson R. & Poglase W. (1975) The enzyme conversion of protoporphyrinogen IX to protoporphyrin IX. Protoporphyrinogen oxidase activity in mitochondrial extracts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **250**: 1269-1274.

Salzman T. & Batlle A. (1986) Heme synthetase in *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.* **85B**: 537-541.

San Martín de Viale L. & Grinstein M. (1968) Porphyrin biosynthesis IV -5 and 6-COOH porphyrinogens (type III) as normals intermediates in haem biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **158**: 79-91.

Sassa S. & Granick S. (1970) Induction of δ -aminolevulinic acid synthetase in chick embryo cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **67**: 517-522.

Schwartz S., Stefenson B. & Sarkar D. (1975) Red, black and blue eggs as models of porphyrin and heme metabolism. *Ann NY Acad Sci.* **244**: 570-592.

Sheera J. & Jordan P. (1975) 5-aminolevulinic acid dehydratase. Alkylation of an essential thiol in the bovine-liver enzyme by active-site-directed reagents. *Eur J. Biochem.* **113**: 435-446.

Shemin D. (1976). Structure, function and mechanism of 5-aminolaevulinate dehydratase. *Phil. Trans. R. Soc. London, B.* **273**: 109-115.

Smith A & Francis J. (1979) Decarboxylation of porphyrinogens by rat liver uroporphyrinogen decarboxylase. *Biochem J.* **183**: 455-461.

Smith A & Francis J. (1981) Investigation of rat liver uroporphyrinogen decarboxylase: comparisons of porphyrinogens I and III as substrates and the inhibition by porphyrins. *Biochem J.* **195**: 241-247.

Stafforini D., Polo C., Stella A. M., Wider de Xifra E. & Batlle A. (1980) Pig liver aminolevulinic acid dehydratase. II. Studies on different conditions influencing its molecular weight determination. *Int. J. Biochem.* **12**: 757-760.

- Tait G. (1968) General aspects of haem synthesis, en Goodwin, T. W. (ed.), *Porphyrins and related compounds*, Biochemical Society Symposio, Academic Press, London-New York, **28**: 19-33.
- Tait G. (1972) Coproporphyrinogenase activities in extracts of *Rhodopseudomonas spheroides* and *Chromatium* strain D. *Biochem J.* **128**: 1159-1169.
- Taketani S. & Tokinaga R. (1981) Rat liver ferrochelatase purification, properties and stimulation by fatty acids. *J. Biol. Chem.* **256**: 12748-12753.
- Tsukamoto Y., Yoshinaga T. & Sano S. (1979) The role of Zn with special reference to essential thiol groups in δ -aminolevulinic acid dehydratase of bovine liver. *Biochim. Biophys. Acta* **570**: 167-178.
- Varticowski L., Kushner J., & Burnham B. (1980) Biosynthesis of porphyrin precursors: Purification and characterization of mammalian L-alanine, γ - δ , dioxovaleric acid aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **255**: 3742-3747.
- Vazquez E., Afonso S., Buzaleh A., Navone N., Polo C., Schoua E. & Batlle A. (1987) The effect of griseofulvin on the heme pathway. Studies on tissue explant cultures. *Toxicology* **46**: 73-82.
- Woods J. (1975) Studies on the role of heme in the regulation of δ -aminolevulinic synthetase during the fetal hepatic development. *Mol. Pharmacol.* **41**: 70-78.
- Woods J. (1988) Regulation of porphyrin and heme metabolism in the kidney. *Seminars in Hematology* **25**: 336-348.
- Woods J. & Fowler B. (1977) Renal porphyrinuria during chronic methyl mercury exposure. *J. Lab Clin Med* **90**: 266-273.
- Woods J. & Fowler B. (1982) Selective inhibition of δ -aminolevulinic acid dehydratase by indium chloride in rat kidney: biochemical ultrastructural studies. *Exp Molec Pathol.* **36**: 306-315.
- Woods J. & Fowler B. (1987) 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.
- Woods J., Eaton D. y Lukens C. (1984) Studies on porphyrin metabolism in the kidney. Effects of trace metals and glutathion on renal uroporphyrinogen decarboxylase. *Molec Pharmacol.* **26**: 336-341.
- Yoda B., Scachter B. & Israels L. (1974) Induction of δ -aminolevulinic acid synthetase in the kidney of chicks treated with porphyrinogenic drugs. *Biochim. Biophys. Acta* **372**: 478-481.
- Yoshinaga T. & Sano S. (1980) Coproporphyrinogen oxidase I. Purification properties, and activation by phospholipids. *J. Biol. Chem.* **225**: 4722-4726.

Zaman Z., Jordan P. & Akhtar M. (1973) Mechanism and stereochemistry of the 5-aminolevulinate synthetase reaction. *Biochem. J.* **135**: 257-263.

CAPITULO II

Biosíntesis de uroporfirinógenos

	Página
II.1. Introducción.....	30
II.2. Propiedades generales.....	30
II.3. Estudios cinéticos.....	34
II.4. Presencia de un dipirrometano como cofactor de la PBG-D. Mecanismo de acción.....	36
II.5. Evidencias acerca del sitio activo de la PBG-D.....	41
II.6. Algunos aspectos genético-moleculares.....	44
II.7. Bibliografía.....	45

II. BIOSINTESIS DE UROPORFIRINOGENOS

II.1. Introducción

El sistema enzimático de la porfobilinogenasa (PBG-asa) cataliza la condensación de cuatro moléculas de PBG con liberación de cuatro de amoníaco para dar el uroporfirinógeno III (Urogen III). Este compuesto es el primer tetrapirrol cíclico del camino metabólico del hemo. Se ha establecido que se requieren al menos dos enzimas para que esta reacción tenga lugar: la PBG-deaminasa (PBG-D), también llamada hidroximetilbilano sintetasa (HMB-S) y la isomerasa, conocida también como Urogen III sintetasa. La PBG-D cataliza la tetrapolimerización del PBG para formar un intermediario lineal e inestable llamado hidroximetilbilano (HMB) o preuroporfirinógeno. La isomerasa cataliza la isomerización y ciclación del hidroximetilbilano a uroporfirinógeno III, intermediario fisiológico en la biosíntesis de hemo, clorofilas y corrinas. En ausencia de isomerasa, el hidroximetilbilano se cicla no enzimáticamente a uroporfirinógeno I. La isomerasa sola no puede actuar ni sobre el PBG, ni tampoco sobre el uroporfirinógeno I, funciona sólo conjuntamente con la PBG-D o sobre el hidroximetilbilano.

II.2. Propiedades generales

Tanto la PBG-asa como sus componentes isomerasa y PBG-D se han aislado y purificado a partir de diversas fuentes. En la mayoría de los casos la PBG-asa es una enzima citoplasmática, pero se ha encontrado actividad de PBG-D en cloroplastos de espinaca (Bogorad, 1955) y en membranas externas de eritrocitos (Falk & Dresel, 1960). Carell & Kahn (1964) determinaron que se pueden sintetizar porfirinas en cloroplastos purificados de *Euglena gracilis* a partir de ALA y PBG (Carell & Kahn, 1964). En nuestro laboratorio se detectó actividad de PBG-asa en fracciones sobrenadante y particulado de este microorganismo, crecido bajo diferentes condiciones de iluminación

(Rossetti *et al.*, 1986), reafirmando de esta manera la hipótesis que los cloroplastos poseen sus propios mecanismos para la formación de porfirinas y clorofilas (Carell & Kahn, 1964). Posteriormente se aisló y purificó la PBG-D citoplasmática y particulada de *Euglena gracilis* crecida en oscuridad (Rossetti *et al.*, 1989). Paralelamente Juknat *et al.* (1989) investigaron la biosíntesis de porfirinas en citoplasma y en cloroplastos aislados de este protista crecido con iluminación. De estos estudios se concluye que la PBG-asa aislada de cloroplastos posee características distintas respecto a la misma enzima presente en células crecidas en oscuridad. Por otra parte estos autores postulan que la PBG-asa particulada está comprometida en la biosíntesis de clorofila, mientras que la enzima citoplasmática participa en la formación de hemo.

Los métodos utilizados para purificar los componentes de la PBG-asa varían de acuerdo con el tejido en estudio, pero todos ellos incluyen combinaciones de los procedimientos clásicos empleados en la purificación de proteínas.

Teniendo en cuenta que la isomerasa, a diferencia de la PBG-D, es una proteína termolábil, frecuentemente se separan por calentamiento a temperaturas y tiempos variables (Llambías & Batlle, 1971b). Con este fin se pueden emplear otros procedimientos, tales como diálisis contra agua destilada, fraccionamiento con resinas de intercambio iónico y tratamiento con fuerza iónica elevada, sin que se produzca la inactivación de uno de ellos (Levin *et al.*, 1967; Stevens *et al.*, 1968; Sancovich *et al.*, 1969; Llambías & Batlle, 1971 a,b).

Se ha purificado a homogeneidad la PBG-D de una gran variedad de fuentes y todas ellas parecen ser enzimas monoméricas con Mr comprendidos entre 34 y 44 kDa (Batlle & Rossetti, 1977; Fumagalli *et al.*, 1985; Juknat *et al.*, 1994). No obstante para la PBG-D de *Rp. palustris* (Kotler *et al.*, 1987) y de eritrocitos humanos (Frydman & Feindstein, 1974) se informaron valores de 74 y 25 kDa respectivamente. Por otro lado se encontró que la PBG-D de *Euglena gracilis* existiría como un dímero de PM 40 kDa, en equilibrio con su monómero de PM 20 kDa (Rossetti *et al.*, 1980). Posteriormente se

demostró que en una cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* existen dos formas para la PBG-D, una de PM 20 kDa y otra de 30 kDa (Correa García *et al.*, 1990).

El comportamiento de la isomerasa en las columnas de filtración por geles depende de la fuerza iónica y de la presencia de ciertos compuestos (Sancovich *et al.*, 1969; Llambías & Batlle 1971a,b), de esta manera, dependiendo de las condiciones experimentales empleadas, se produciría una asociación de las unidades de la proteína formando agregados moleculares, pareciendo así lógico la diversidad de Mr informados para esta enzima.

Tanto la PBG-asa como la PBG-D manifiestan su máxima actividad a pH's comprendidos entre 7,2 y 8,1 dependiendo de la fuente enzimática utilizada. Las curvas de actividad en función del pH son similares para ambas enzimas según se mida la uroporfirina formada o el PBG consumido. Este comportamiento no se observó con la PBG-asa y la PBG-D de callos de soya (Llambías & Batlle 1971a). En este caso se obtuvo para ambas enzimas un único pico a pH 7,2 cuando se expresó la actividad enzimática en base a la uroporfirina formada. Cuando se midió el consumo de sustrato la forma de las curvas de pH fueron análogas para ambas enzimas, pero se observaron dos máximos. Estos resultados sugieren que el consumo de sustrato ocurriría en dos etapas con distintos pH's óptimos.

Conford (1964) demostró que la cantidad y concentraciones relativas de los isómeros I y III dependen del pH y de la composición salina del medio, ya que estos factores pueden afectar la formación de un complejo activo PBG-D-isomerasa. En ausencia de NaCl el pH óptimo para la formación de porfirinas se encuentra entre 7,2 y 8,1, pero en presencia de una concentración 148 mM de esta sal se obtiene un máximo de actividad a pH 7,8. El efecto de las sales de sodio en la formación de los isómeros I y III se manifestó a todos los pH estudiados. Resultados similares se obtuvieron empleando fracciones parcialmente purificadas de hígado bovino (Sancovich *et al.*, 1969).

La PBG-asa y la PBG-D se comportaron como enzimas sulfhidrúlicas en diversas fuentes (Frydman & Feinstein, 1964; Sancovich *et al.*, 1969; Llambías & Batlle, 1971a,b; Fumagalli *et al.*, 1991). Varios reactivos clivantes de la unión disulfuro inhiben parcialmente la reacción (Llambías & Batlle 1971b, Sancovich *et al.*, 1976).

Ya se mencionó la estabilidad térmica de la PBG-D. Esta enzima puede calentarse hasta 65°C durante tiempos variables con el fin de purificarla, a temperaturas superiores sufre generalmente una considerable inactivación (Sancovich *et al.*, 1969; Llambías & Batlle, 1971a,b; Mazzetti & Tomio, 1988; Jones & Jordan, 1994). Una excepción es la que brinda la PBG-D de *Chlorella regularis*, esta enzima retuvo el 87 % de actividad luego de preincubarla a 75°C durante 1 hora (Shioi *et al.*, 1980).

Sancovich *et al.* (1969), aislaron de preparaciones parcialmente purificadas de PBG-asa de hígado bovino, un factor que estimula la síntesis de uroporfirinógenos a partir de PBG. Por otra parte, se aisló del citosol de hígado de rata una molécula de bajo peso molecular que ejerce un efecto protector sobre la PBG-D de eritrocitos de ave frente a la intoxicación por plomo (Tephly, 1975). Piper & van Lier (1977) observaron la acción antagonista del ácido fólico sobre dicho factor y establecieron que el mismo podría ser atribuido a derivados del pteroilglutamato. En nuestro laboratorio se detectó en *Euglena gracilis* una molécula que regula la síntesis enzimática de porfirinógenos (Juknat *et al.*, 1981), ésta se purificó y mediante estudios de espectroscopía de fluorescencia, IR y RMN se estableció que su estructura corresponde a una 6-biopterina (Figura I-II.1) (Juknat *et al.*, 1988a,b).

Experiencias realizadas *in vitro* con fracciones parcialmente purificadas de PBG-D de hígado de rata demostraron que varias sulfonamidas son inhibidores no competitivos de esta enzima (Peters *et al.*, 1980). Por otra parte, Christenson *et al.* (1986) realizaron estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para elucidar el efecto de la sulfamerazina sobre la actividad de la isomerasa de hígado de rata. Estos autores demostraron que esta droga interfiere en la interacción de la PBG-D con la isomerasa, ya que inhibe esta última enzima en su capacidad de dirigir la formación de uroporfirinógeno III. Esta inhibición se revierte *in*

vitro por el agregado de ácido fólico. En concordancia con estos resultados, se encontró en nuestro laboratorio que la sulfamerazina inhibe *in vivo* la actividad de la PBG-D de eritrocitos de rata (Kotler *et al.*, 1988a) y que *in vitro* el ácido fólico revierte totalmente esta inhibición (Kotler *et al.*, 1988b).

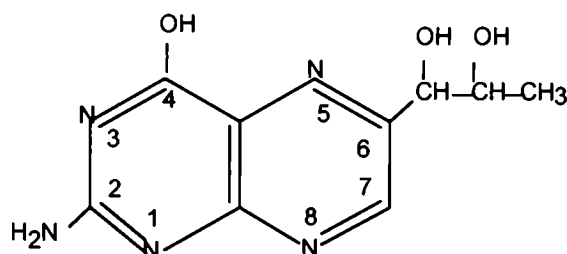


Figura I-II.1: Estructura de la 6-biopterina.

Si bien se acepta que la conversión enzimática de PBG a uroporfirinógenos es un proceso anaeróbico (Llambías & Batlle, 1971a), en muchos casos se observó que la PBG-asa y la PBG-D eran igualmente activas en presencia o ausencia de oxígeno (Bogorad 1958a,b; Sancovich *et al.*, 1969; Llambías & Batlle, 1971b). Dado que la síntesis de uroporfirinógenos en callos de soya disminuye notoriamente en incubaciones llevadas a cabo aeróbicamente (Llambías & Batlle, 1970a; Stella *et al.*, 1971) sin que se modifique el consumo de sustrato, se postuló que la presencia de oxígeno no impediría la formación de intermediarios pero que los oxidaría, evitando así la formación de producto.

II.3. Estudios cinéticos

Estudios cinéticos revelaron que en muchas fuentes la PBG-asa es una enzima alostérica, que posee por lo menos dos sitios de unión para el sustrato por molécula de enzima. En algunos casos se encontró cooperatividad positiva (Sancovich *et al.*, 1969) y

en otros cooperatividad negativa (Llambías *et al.*, 1971a), indicando así que la PBG-asa está adaptada a la regulación por sustrato.

Cuando se estudió la cinética de las enzimas de hígado bovino en distintas condiciones experimentales, se observó un comportamiento homotrópico positivo (Sancovich *et al.*, 1969). En el caso de la PBG-asa, los gráficos de inversas fueron no lineales y el coeficiente de Hill tendía a 2. Sin embargo, cuando el extracto enzimático se calentó o dializó contra agua destilada o cuando se agregaron iones amonio en la mezcla de reacción, se perdió esta interacción homotrópica. Concomitantemente aumentó la afinidad por el PBG y se formó Urogen I en lugar del isómero III. Estos resultados indican que la PBG-D de hígado bovino presenta una clásica cinética de Michaelis-Menten. Los iones amonio actúan sobre la PBG-D como inhibidores no competitivos, pero inhiben competitivamente a la isomerasa.

Llambías & Batlle (1971b) purificaron la PBG-asa y la PBG-D de eritrocitos de ave y estudiaron su cinética. Tanto en presencia como en ausencia del inhibidor amonio, estas enzimas exhibieron un comportamiento semejante al de las enzimas de hígado bovino.

Es interesante destacar que los estudios cinéticos llevados a cabo con las enzimas purificadas de callos de soya (Llambías & Batlle, 1970 a,b) revelaron que tanto la PBG-asa como la PBG-D poseen un comportamiento cinético totalmente diferente al de las mismas enzimas provenientes de otras fuentes. Las curvas de saturación para la PBG-asa y la PBG-D, en presencia o ausencia de iones amonio, fueron muy similares. Estas manifestaron una cinética no michaeliana con gráficos de inversas bifásicos, que dieron origen a dos valores de K_m . Estos resultados sugieren que tienen lugar dos reacciones, una de ellas alcanza la saturación a bajas concentraciones de PBG, mientras que la otra lo haría a concentraciones más altas.

Para corroborar más fehacientemente esta desviación del comportamiento michaeliano, se calcularon los valores de R_s y el coeficiente de Hill para ambas enzimas.

La PBG-asa reveló un R_s mayor que 81 y un n de Hill menor o tendiendo a 1 a bajas y altas concentraciones de sustrato respectivamente, respondiendo de esta forma a una cinética homotrópica negativa (Llambías & Batlle, 1970b).

Cuando se analizó el comportamiento cinético de la PBG-asa de cepas salvajes y mutantes de *S. cerevisiae* (Araujo *et al.*, 1989) se encontró que las curvas de saturación seguían una cinética michaeliana, con gráficos de dobles recíprocas lineales y un coeficiente de Hill igual a 1, en concordancia con lo observado para la PBG-asa de *Euglena gracilis* (Rossetti *et al.*, 1986), pero en desacuerdo con lo hallado para la enzima de hígado bovino (Sancovich *et al.*, 1969), callos de soya (Llambías & Batlle, 1970a,b; 1971a), eritrocitos de ave (Llambías & Batlle, 1971b) y *Rp. palustris* (Juknat de Gernalnik, 1983).

Empleando un extracto de PBG-D parcialmente purificado de *Euglena gracilis*, se estudió la dependencia de la $V_{\text{máx}}$ y de la relación $V_{\text{máx}}/K_m$ con el pH (Williams *et al.*, 1981). En este trabajo se postula la presencia de dos grupos ionizables importantes para la catálisis. Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizaron fracciones parcialmente purificadas de PBG-D de bazo de rata (Williams, 1984) de eritrocitos humanos (Smythe & Williams, 1988) y *Scenedesmus obliquus* (Juknat *et al.*, 1994).

II.4. Presencia de un dipirrometano como cofactor de la PBG-D.

Mecanismo de acción

Una de las propiedades más sorprendentes de la PBG-D es su habilidad para formar complejos enzima-sustrato con una, dos, tres ó cuatro unidades pirrólicas unidas al sitio catalítico (Anderson & Desnick, 1980). Mediante experiencias realizadas con sustrato radioactivo se pudo establecer que la primera molécula que se une al sitio activo es la que resultará ser el anillo A en el preuroporfirinógeno, uniéndose secuencialmente los anillos B, C y D (Battersby *et al.*, 1979). Por otro lado se ha clonado y secuenciado el gen que codifica a la PBG-D de *Escherichia coli* (Thomas & Jordan, 1986). Así se han

obtenido cepas que aumentan casi en 100 veces los niveles de PBG-D respecto a la cepa salvaje (Jordan *et al.*, 1986). Gracias a la sobreexpresión de genes clonados y a las técnicas de FPLC, se logró la separación de los complejos enzima-sustrato.

Experiencias llevadas a cabo con la PBG-D de *Rhodopseudomonas sphaeroides* establecieron que la primera molécula de sustrato se une covalentemente a la enzima (Jordan & Berry, 1981). Mediante estudios de RMN Battersby y colaboradores (1983) postularon que en esta unión estaría involucrada una lisina; sin embargo, otros datos indicaron que sería el grupo sulfhidrilo de una cisteína (Jordan *et al.*, 1988).

Analizando las propiedades espectrales de la holoenzima purificada de PBG-D de *E. coli*, se observaron a pH 8 débiles bandas de absorción a 410 y 500 nm. Cuando se acidificó esta solución a pH 3,5 se produjo un brusco cambio en el espectro, apareciendo una intensa banda a 490 nm (Jordan & Warren, 1987). Se obtuvieron resultados similares con la enzima cristalizada. Cuando los cristales crecen en presencia de un buffer ácido son rosados, mientras que aquellos que lo hacen en presencia de un buffer alcalino tienen una coloración amarillenta. Estos hallazgos sugirieron la existencia de un grupo prostético, que se protona en medio ácido para dar un cromóforo rosado pero es prácticamente incoloro a pH's neutros (Thomas & Jordan, 1986). Tratando a la PBG-D con ácido fórmico al 10% durante una hora, el máximo de absorción a 490 nm disminuyó a expensas de la aparición de un pico a 405 nm. La solución resultante exhibió una intensa fluorescencia roja al ser irradiada con luz ultravioleta, lo cual era indicativo de la presencia de porfirinas. Se determinó la naturaleza de esta porfirina por medio de HPLC, estableciéndose que la misma es uroporfirina I (Jordan & Warren, 1987). Es conocido el hecho que en medio ácido la porfirinas pueden formarse a partir de pirrometanos, de esta manera se postuló la existencia de un dipirrometano unido a la PBG-D. Esta hipótesis se reforzó cuando se analizó espectroscópicamente el producto obtenido de la reacción de la PBG-D con el reactivo de Ehrlich. En este caso los cambios espectroscópicos observados guardan semejanza con el resultado logrado al tratar un pirrometano sintético con dicho reactivo (Jordan & Warren, 1987). Este cambio se debe a que el pigmento inicialmente formado se tautomeriza a pirrometano (Hart *et al.*, 1987). Este cofactor es

responsable de la unión del sustrato y de dirigir la síntesis del tetrapirrol en el sitio catalítico (Jordan & Warren, 1987).

Por otro lado, Hart y colaboradores (1987) establecen que la cadena de PBG, que dará lugar a la formación de hidroximetilbilano, se une a dicho cofactor dipirrometano a través de la posición α libre de su anillo terminal y que este cofactor está unido a la enzima por medio de un grupo Y. La elucidación de la naturaleza del grupo Y se enfrentó con el problema de hallar la forma de romper la unión del dipirrometano a la enzima sin dañar la estructura proteica. Estos mismos autores encontraron las condiciones para llevar a cabo este proceso (Hart *et al.*, 1988) y la proteína resultante (apoenzima) perdió toda su actividad catalítica. Sin embargo cuando se incubó a la apoenzima con PBG, se recuperó entre el 50 y el 60 % de la actividad enzimática inicial. De este resultado se concluye que no es necesaria una enzima adicional para que el cofactor dipirrometano se una a la apoenzima a través del grupo Y para formar la PBG-D (Hart *et al.*, 1988). Incubando la apoenzima con $[11-^{13}\text{C}]\text{PBG}$ el ^{13}C se unió directamente al grupo Y. Estudios de RMN de ^{13}C revelan que el dipirrometano está unido a la enzima a través de una cisteína (Hart *et al.*, 1988). Posteriormente este mismo grupo de trabajo determinó que el cofactor está unido al residuo cisteína 242 de la enzima (Miller *et al.*, 1988).

Hay evidencias que sugieren que este cofactor dipirrometano contribuye apreciablemente al plegamiento y estabilidad de la proteína (Warren & Jordan, 1988; Scott *et al.*, 1989).

Estudios realizados con la PBG-D de *E. coli* señalan la existencia de un único sitio activo, formado por un sitio de unión para el sustrato (S) y otro sitio de unión para el cofactor (C) (Warren & Jordan, 1988). Recientemente Jordan *et al.* (1996) han determinado que la unión del cofactor dipirrometano se origina en la reacción del preuroporfinógeno con la apoenzima. Este hallazgo permite explicar la existencia de las mutantes inactivas D84A y D84N.

Diversas hipótesis se han postulado para explicar el mecanismo de acción de la PBG-asa. En nuestro laboratorio se pudo determinar a partir de estudios realizados con esta enzima de callos de soya la existencia de intermediarios polipirrólicos de cadena abierta (Llambías & Batlle, 1971a). Los resultados obtenidos posteriormente en experiencias llevadas a cabo con esta misma enzima de *E. gracilis* (Rossetti *et al.*, 1977) y *Rp palustris* (Kotler *et al.*, 1991) sustentaron este hallazgo.

A partir de estos estudios cinéticos, se propuso que la conversión de PBG en uroporfirinógeno I ó III ocurre en dos etapas. En la primera tendría lugar la formación de un intermediario polipirrólico y en la segunda, la ciclación para formar el uroporfirinógeno (Llambías & Batlle, 1971a,b; Stella *et al.*, 1971; Rossetti & Batlle, 1977).

Estas observaciones permitieron dilucidar el mecanismo de acción, actualmente aceptado, para la biosíntesis de uroporfirinógenos I y III. El mismo se esquematiza en la Figura I-II.2. El cofactor dipirrometano está unido covalentemente a la enzima en el sitio C. Como ya se mencionó, esta unión se establece entre el átomo de S de la cisteína 242 de la cadena polipeptídica y el carbono que lleva el grupo amino en la molécula de PBG. La primera molécula de PBG se une a la enzima en el sitio S. Allí tiene lugar una deaminación para dar un azafulveno protonado (Figura I-II.3), que ataca electrofílicamente a la posición α libre del cofactor, de esta forma se origina el complejo E-S. Análogamente se incorporan otras moléculas de PBG hasta formar el hidroximetilbilano. Este tetrapirrol se libera del complejo enzima-cofactor. En ausencia de isomerasa el hidroximetilbilano se cicla no enzimáticamente para formar el uroporfirinógeno I. En presencia de isomerasa se produce la rotación del anillo D, para luego ciclarse y así formar el uroporfirinógeno III.

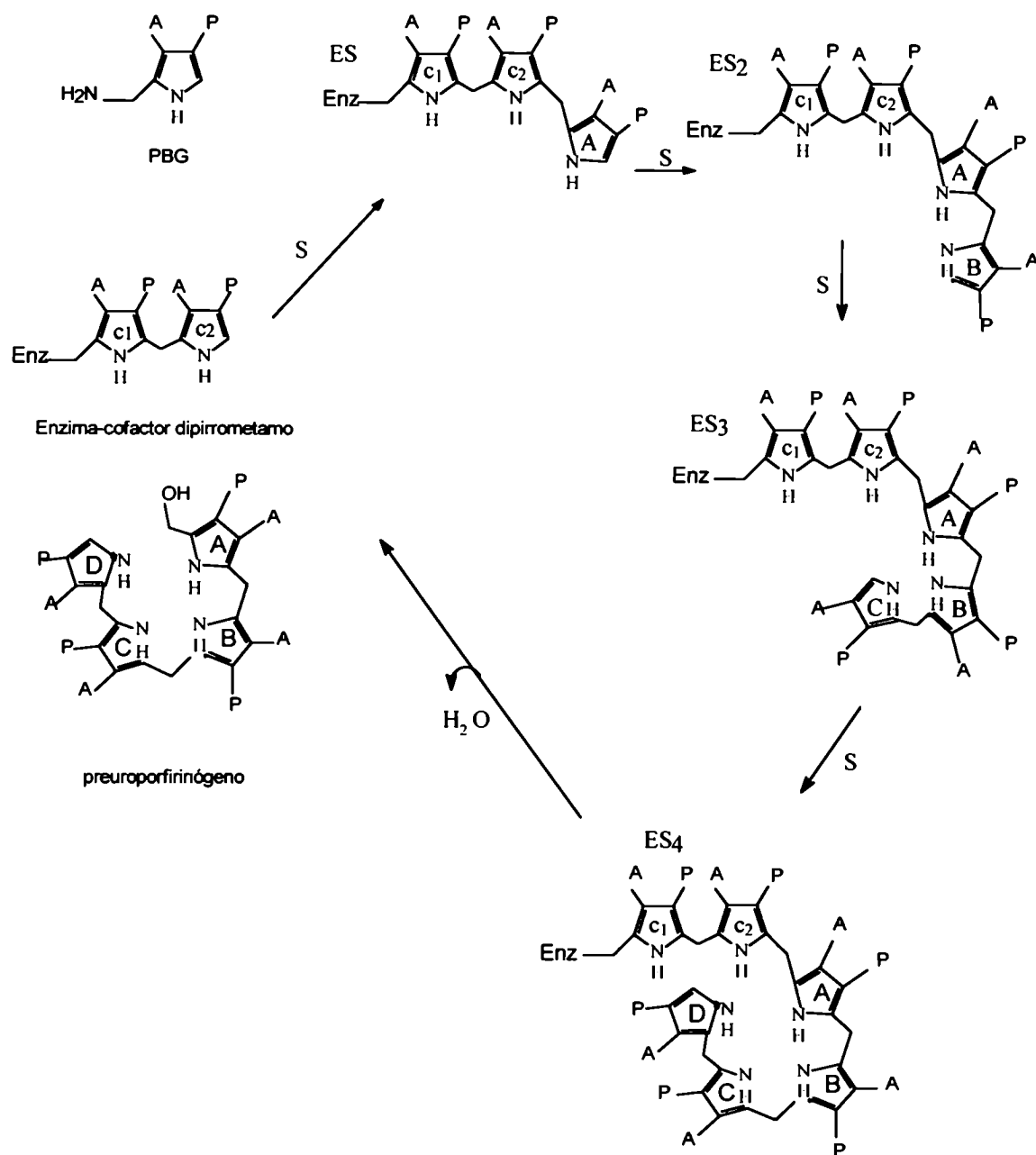


Figura I-II.2: Síntesis de hidroximetilbilano. A: Acetato; P: Propionato.

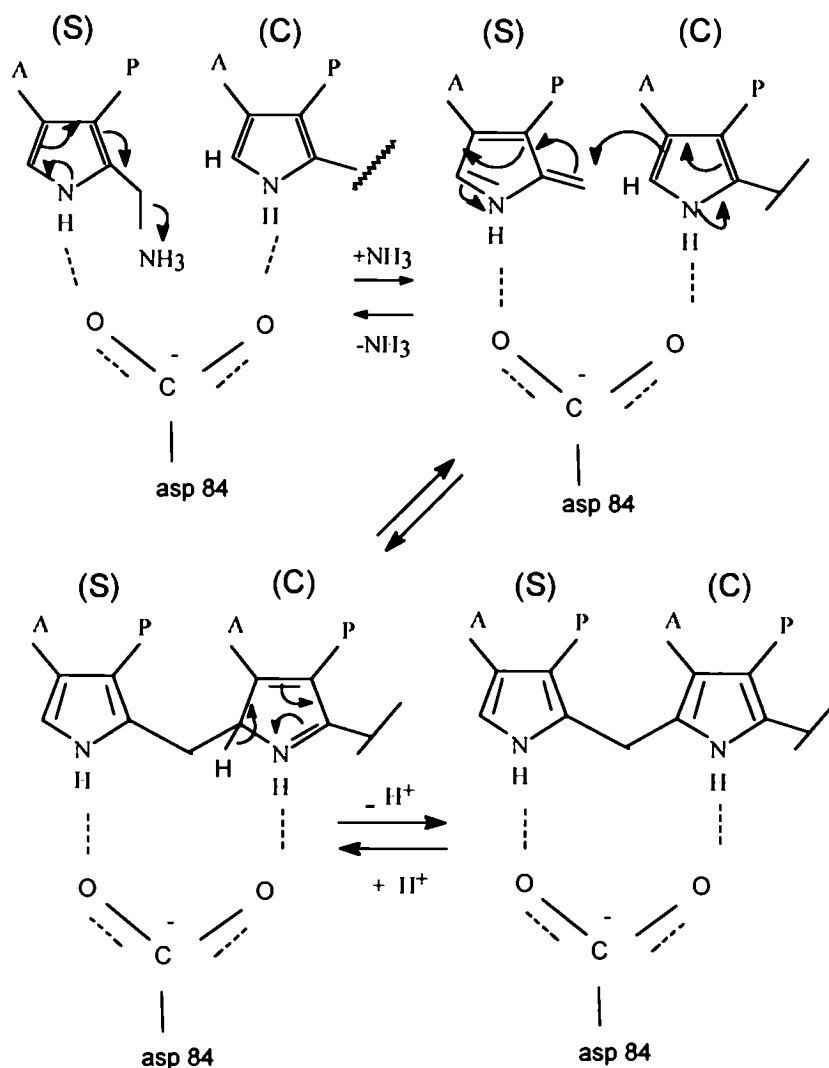


Figura I-II.3: Mecanismo de reacción catalizado por la PBG-D. Formación de un azafulveno protonado.

II.5. Evidencias acerca del sitio activo de la PBG-D

Se han secuenciado las deaminasas de *E. coli* (Alefounder *et al.*, 1988), humana (Raich *et al.*, 1986), de rata (Stubnicer *et al.*, 1988) y de *E. gracilis* (Sharif *et al.*, 1989). Muchos aminoácidos se conservan en todas estas enzimas y esto dificulta la asignación de los residuos involucrados en el sitio activo. Resultó sorprendente encontrar 12 residuos arginina en las posiciones 7, 11, 101, 131, 132, 149, 155, 182, 206, 232 y 277. Con el fin de esclarecer el papel que desempeñan estos residuos presentes en número

invariable en diversos organismos, en el mecanismo de reacción, se llevaron a cabo estudios por mutagénesis dirigida del gen *hemC* que codifica para la PBG-D de *Escherichia coli*. El reemplazo de las argininas 131 y 132 por histidinas, produjo una PBG-D incapaz de unir al cofactor dipirrometano ya que estos residuos proveen los grupos cargados positivamente que son necesarios para la interacción con las cadenas propionato y acetato en el sitio de unión C (Warren & Jordan, 1988). Las mutantes R11H y R155H si bien unen al cofactor, forman el complejo ES con gran dificultad a bajas concentraciones de sustrato. Esta observación sugiere que las argininas 11 y 155 son cruciales para la unión de los grupos carboxilato en el sitio S. Estos residuos están involucrados en la unión de las siguientes moléculas de sustrato. Dado que el paso $E \rightarrow ES$ no está favorecido, las actividades de estas mutantes son extremadamente bajas. Mediante el estudio de la estructura cristalina de la PBG-D de *Escherichia coli* se estableció que las cadenas laterales de arginina-11 y -155 se encuentran cercanas entre sí e interactúan con el anillo C_2 del cofactor en la holoenzima. Los efectos resultantes de las mutaciones de las argininas -176, -232 y -149 por histidinas fueron menos severos. En este caso están afectados los últimos pasos del mecanismo y reflejan una ubicación más periférica en el sitio catalítico. Las mutaciones R131H, R132H, R11H y R155H dan como resultado enzimas con muy baja actividad. En todos estos casos están involucrados residuos que interactúan con los anillos del cofactor dipirrometano e interfieren con los primeros pasos del mecanismo. Por el contrario, las mutaciones R149H, R176H y R232H generan enzimas con actividades específicas muy similares a la de la cepa salvaje y afectan los estados más tardíos del proceso de tetrapolimerización. No se ha encontrado ninguna mutante que acumule el complejo ES_1 , de esta forma se sustenta la participación de un único sitio catalítico.

Este mismo tipo de estudio reveló la existencia de cinco aspartatos (D46, D76, D84, D106 y D209) y de dos glutamatos (E65 y E231) conservados en todas las especies estudiadas (Thomas & Jordan, 1986; Raich *et al.*, 1986; Stubnicer *et al.*, 1988; Beaumont *et al.*, 1989; Sharif *et al.*, 1989; Petricek *et al.*, 1990).

El aspartato-84 está ubicado en una región altamente conservada de la secuencia de *E. coli*, V-H-S-M-K-D-V-P, la misma se extiende desde el residuo 79 hasta el 86 (Thomas & Jordan, 1986). La estructura cristalina de la PBG-D de *E. coli* indicó que el aspartato-84 está ubicado cerca de los sitios S y C (Louie *et al.*, 1992), así puede estabilizar la carga positiva de los átomos de nitrógeno del azafulveno y del pirrol nucleofílico ya que provee un grupo cargado negativamente estratégicamente ubicado (Woodcock & Jordan, 1994).

Mediante modificaciones químicas se pudo establecer la presencia de un residuo lisina en las cercanías o bien formando parte del sitio activo de la PBG-D de *E. gracilis* y *Rp. sphaeroides* (Hart *et al.*, 1984) y *E. coli* (Hart *et al.*, 1986). En esta última fuente se investigó la ubicación de esta lisina (Miller *et al.*, 1989). La secuencia de los péptidos marcados reveló que en realidad se encuentran dos residuos de lisina en posiciones 55 y 59. Ambos se conservan en todas las secuencias de PBG-D hasta ahora conocidas y se postula que deben cumplir un papel relevante. Empleando técnicas de mutagénesis dirigida, se han sustituido por residuos de glutamina (Hädener *et al.*, 1990). De esta manera se estableció que la lys-59 está más comprometida en la unión del sustrato que en la catálisis.

Los resultados obtenidos al estudiar el efecto de la modificación de las cisteínas fueron dispares. Mientras que en algunas fuentes la PBG-D se inactivó (Jordan & Shemin, 1973), en otras no se observó ningún cambio (Mazzetti & Tomio, 1988).

La PBG-D nativa de *E. coli* no reacciona frente a los reactivos de grupos tiólicos, pero los complejos con una, dos y tres moléculas de sustrato aumentan su sensibilidad frente a estos compuestos. Presumiblemente un grupo tiólico quedaría expuesto por algún cambio conformacional de la proteína y la modificación de este grupo conduciría a la desactivación total de la enzima (Warren & Jordan, 1988).

II.6. Algunos aspectos genético-moleculares

El gen de esta enzima ha sido asignado al cromosoma 11 en la región 11q23-11qter (Meisler *et al.*; 1980 Wang *et al.*, 1981). Posteriormente se clonó y secuenció el cDNA correspondiente al mismo (Raich *et al.*, 1986). Los análisis de Southern blot revelaron la presencia de una sola copia del gen que codifica para la PBG-D en el genoma humano. Las regiones no codificantes del cDNA eritropoyético contienen 81 bases en el extremo 5' terminal antes del codón de iniciación metionina y 267 bases en el extremo 3' terminal seguido por 14 bases de la señal de poli A.

Por otra parte se caracterizaron dos isoenzimas a partir de células eritropoyéticas y no eritropoyéticas que difieren en 2000 Da (Grandchamp *et al.*, 1987). El DNA genómico de la PBG-D humana contiene aproximadamente 10 Kb y 15 exones. Se identificaron los dos promotores, uno para la enzima eritropoyética y el otro para la no eritropoyética, que se encuentran separados por 3 Kb (Chretien *et al.*, 1988). Estos promotores generan dos mRNA que difieren en el extremo 5'terminal. El promotor no eritroide es rico en G + C pero no contiene las clásicas secuencias TATA box y CAAT box. El promotor eritropoyético tiene, en cambio, una estructura semejante al promotor del gen de la β -globina que incluye TATA box, CAAT box y CAAC box (Chretien *et al.*, 1988).

La PBG-D eritropoyética posee un péptido adicional con 17 aminoácidos en el extremo N-terminal (Chretien *et al.*, 1988), de esta forma se explica la diferencia en el peso molecular entre la enzima eritropoyética (42 kDa) con 344 aminoácidos y la no eritropoyética (44 kDa) con 361 aminoácidos.

II.7. Bibliografia

- Alefounder P., Abell C. & Battersby A. (1988) The sequence of heme C, hemD and two additional *E. coli* genes. *Nucl. Acid Res.* **16**: 9871.
- Anderson P & Desnick R. (1980). The purification and properties of Uroporphyrinogen Synthase from human erythrocytes. Identification of stable enzyme substrate intermediates. *J. Biol. Chem.* **255**: 1983-1999.
- Araujo L., Lombardo M. E., Rossetti M. V. & Batlle A. (1989). *Saccharomyces cerevisiae* porphobilinogenase; some physical and kinetic properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **92 B**: 297-301.
- Batlle A. & Rossetti M. V. (1977) Enzymic polymerization of porphobilinogen into uroporphyrinogens. *Review Int. J. Biochem.* **8**: 251-267.
- Battersby A., Fookes C., Gustafson-Potter K., Matcham G. & Mc Donald D. (1979) 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.
- Battersby A., Fookes C. Matcham G. & Mc Donald E. (1983) Biosynthesis of porphyrins and related macrocycles. Purification of deaminase and studies on its mode of action. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 3031-3040.
- Beaumont C., Porcher C., Yves N. & Grandchamp B. (1989) The mouse porphobilinogen deaminase gene. Structural organization, sequence around the cap site. *Nucl. Acid. Res.* **18**: 6509-6515.
- Bogorad L. (1955), The enzymic synthesis of uroporphyrin III. *Plant. Physiol.* **30**, XIV.
- Bogorad L. (1958a). The enzymic synthesis of porphyrins from porphobilinogen I. Uroporphyrin I. *J. Biol. Chem.* **233**: 501-509.
- Bogorad L. (1958b) The enzymic synthesis of porphyrins from porphobilinogen II. Uroporphyrin III. *J. Biol. Chem.* **233**: 510-519.
- Carell E & Kahn J. (1964) Synthesis of porphyrins by chloroplasts of *Euglena gracilis*. *Arch. Biochem. Biophys.* **108**: 1-6.
- Chretien S., Dubart A., Beaupain D., Raich N., Grandchamp B., Rosa J., Groossens M. & Romeo P. (1988) Alternative transcription and splicing of the human PBG-D gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6-10.
- Christenson W., Reddy V. & Piper W. (1986) Reversal of sulfamerazine inhibition of rat hepatic uroporphyrinogen synthesis by folic acid. *Life Sci.* **38**: 156-159.
- Conford P. (1964) Transformation of PBG into porphyrins by preparations from human erythrocytes. *Biochem. J.* **91**: 64-73.

Correa García S., Rossetti M. V. & Batlle A. (1990) Different porphobilinogen deaminase forms in wild and mutant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Biochem.* **23**: 1019-1023.

Falk J & Dresel E. (1960) Pseudoporphyrin and enzymic and non enzymic porphyrin formation *in vitro*. *Biochim Biophys. Acta* **39**: 458-462.

Frydman R & Feinstein G. (1974) Studies on porphobilinogen deaminase and Uroporphyrinogen III cosynthetase from human erythrocytes. *Biochim. Biophys Acta* **350**: 358-373.

Fumagalli S., Kotler M., Rossetti M. V. & Batlle A. (1985) Human red cell porphobilinogen deaminase. A simpler method of purification and some unusual properties. *Int. J. Biochem.* **17**: 485-494.

Fumagalli S., Kotler M., Rossetti M. V. & Batlle A. (1991) Studies on uroporphyrinogen biosynthesis in pig liver. *Z. Naturforsch.* **46c**: 1101-1108.

Grandchamp B., De Verneuil H., Beaumont C., Chretien S., Walter O. & Nordmann Y. (1987) Tissue specific expression of porphobilinogen deaminase. Two isoenzymes from a single gene. *Eur J. Biochem.* **162**: 105-110.

Hädener A., Alefounder P., Hart G., Abell C. & Battersby A. (1990) Investigation of putative active site lysine residues in hydroxy methylbilane synthetase: preparations of human mutants in which (a) Lys-55, (b) Lys-59, and (c) both Lys-55 and Lys-59 have been replaced by glutamine. *Biochem J.* **271**: 487-491.

Hart G. & Battersby A. (1985) Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase (co-synthetase) from *Euglena gracilis*. *Biochem. J.* **232**: 151-160.

Hart G., Leeper F.J. & Battersby A.R. (1984) Modification of hydroxymethylbilane synthase by pyridoxal 5'- phosphate. *Biochem. J.* **222**: 93-102.

Hart G., Abell C. & Battersby A. (1986) Purification, N-terminal amino acid sequence and properties of hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **240**: 273-276.

Hart G., Miller A., Leeper F. & Battersby A. (1987) Biosynthesis of the natural porphyrins: Proof that hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) uses a novel binding group in its catalytic action. *J. Soc. Chem. Commun.*: 1762-1765.

Hart G., Miller A., Leeper F. & Battersby A. (1988) Evidence that the pyrromethane cofactor of the hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) is bound through a sulphur atom of a cysteine residue. *Biochem. J.* **252**: 909-912.

Jones R. & Jordan P. (1994) Purification and properties of porphobilinogen deaminase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* **299**: 895-902.

Jordan P. & Berry A. (1981) Mechanism of action of porphobilinogen deaminase. *Biochem. J.* **195**: 177-181.

Jordan P. & Shemin D. (1973) Purification and properties of uroporphyrinogen I synthetase from *Rhodospirillum rubrum*. *J. Biol. Chem.* **248**: 1019-1024.

Jordan P. & Warren M. (1987). Evidence for the dipyrromethane cofactor at the catalytic site of *E. coli* porphobilinogen deaminase. *FEBS Lett.* **225**: 87-92.

Jordan P., Marshall L. & Thomas S. (1986) in *Porphyrins and Porphyrins* (Nordman Y. ed.) **134**: 83-93.

Jordan P., Thomas S. & Warren M. (1988) Purification, crystallization and properties of porphobilinogen deaminase from a recombinant strain of *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* **254**: 427-435.

Jordan P., Warren M. & Awan J. (1996) Discovery that the assembly of the dipyrromethane cofactor of porphobilinogen deaminase holoenzyme proceeds initially by the reaction of preuroporphyrinogen with the apoenzyme. *Biochem. J.* **316**: 373-376.

Juknat A. (1983) *Biosíntesis enzimática de porfirinógenos*. Tesis doctoral. FCEyN/UBA.

Juknat de Gernalnik A, Rossetti M & Batlle A. (1981) Porphyrin biosynthesis in *Euglena gracilis*. IV. An endogenous factor controlling the enzymic synthesis of porphyrinogens and its possible role in the treatment of some porphyrias. *Int. J. Biochem.* **132**: 343-353.

Juknat A., Dörnemann D. & Senger H. (1988a) Biosynthesis of porphyrinogens in etiolated *Euglena gracilis* Z. I. Isolation and purification of an endogenous factor stimulating the formation of porphyrinogens. *Z. Naturforsch.* **43c**: 351-356.

Juknat A., Dörnemann D. & Senger H. (1988b) Biosynthesis of porphyrinogens in etiolated *Euglena gracilis* Z. II. Identification of a regulatory pteridine. *Z. Naturforsch.* **43c**: 357-362.

Juknat A., Dörnemann D. & Senger H. (1989) Different porphobilinogenases in cytoplasm and isolated chloroplasts from light grown *Euglena gracilis* Z. *Z. Naturforsch.* **44c**: 81-84.

Juknat A., Dörnemann D. & Senger H. (1994) Purification and kinetic studies on a porphobilinogen deaminase from the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*. *Plant* **193**: 123-130.

Kotler M., Fumagalli S., Juknat A. & Batlle A. (1987) Porphyrin biosynthesis in *Rp. palustris* VIII: Purification and properties of deaminase. *Comp. Biochem Physiol.* **87B**: 601-606.

Kotler M., Juknat A., Correa García S. & Batlle A. (1988a) The action of sulfamerazine on porphyrin biosynthesis in rats. *Med. Sci. Res.* **16**: 323-324.

Kotler M., Juknat A., Correa García S., Princ F. & Batlle A. (1988b) *In vitro* sulphamerazine inhibition of rat blood uroporphyrinogen I synthetase and its reversal by folic acid. *Med. Sci. Res.* **16**: 983-984

Kotler M., Juknat A., Fumagalli S. & Batlle A. (1991) Involvement of free and enzyme- bound intermediates in the reaction of the mechanism catalyzed by the bovine liver immobilized

porphobilinogen deaminase. Proof that they are substrates for cosynthetase in uroporphyrinogen III biosynthesis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**: 173-180.

Levin E & Coleman D. (1967) The enzymic conversion of PBG to urogen catalyzed by extracts of hematopoietic mouse spleen. *J. Biol. Chem.* **242**: 4248-4253.

Lockwood W & Benson A. (1960) The enzymic condensation of PBG to porphyrins. *Biochem J.* **75**: 372-381.

Louie G., Brownlie P., Lambert R., Cooper J., Blundell T., Woods S., Warren M., Woodcock & Jordan P. (1992) Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site. *Nature* **359**: 33-39.

Llambías E & Batlle A. (1970a) Porphyrin biosynthesis in soybean callus V. The Porphobilinogen Deaminase- Uroporphyrinogen III cosynthetase. *FEBS Lett.* **9**: 552-559.

Llambías E & Batlle A. (1970b). Negative homotropic kinetics of soybean callus Porphobilinogen Deaminase, Uroporphyrinogen III cosynthetase. *FEBS Lett.* **9**: 180-182.

Llambías E & Batlle A (1971a) Studies on porphobilinogen deaminase Uroporphyrinogen III cosynthetase system of cultured soybean cells. *Biochem. J.* **121**: 327-340.

Llambías E & Batlle A. (1971b) Porphyrin biosynthesis. Avian erythrocyte PBG deaminase Urogen III cosynthetase, its purification, properties and separation of its components. *Biochim. Biophys. Acta* **227**: 180-191.

Mazzetti M. & Tomio J. (1988) Characterization of porphobilinogen deaminase from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **957**: 97-104.

Meisler M., Wanner L., Eddy R. & Shows T. (1980) The UPS locus encoding uroporphyrinogen I synthase is located on human chromosome 11. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **95**(1): 170-176.

Miller A., Packman L., Hart A., Alefounder P., Abel C. & Battersby A. (1988) Evidence that pyridoxal phosphate modification of lysine residues (Lys-55 and Lys-59) causes inactivation of hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase). *Biochem. J.* **262**: 119-124.

Peters P., Sharma M., Hardwicke D & Piper W. (1980) Sulfonamide inhibition of rat hepatic uroporphyrinogen I synthetase activity and the biosynthesis of heme. *Arch. Biochem. Biophys.* **201**: 88-94.

Petricek M., Rutberg L., Schroeder Y. & Hederstedt L. (1990) Cloning and characterization of the hemA region of the *Bacillus subtilis* chromosome. *J. Bacteriol.* **172**: 2250-2258.

Piper W & van Lier R. (1977) Pteridine regulation of inhibition of hepatic uroporphyrinogen I synthetase by lead chloride. *Molec. Pharmacol.* **13**: 1126-1135.

Raich N., Romeo P., Dubart A., Beaupain D., Cohen-Solal M. & Groosens M. (1986) Molecular cloning and complete primary sequence of human erythrocyte porphobilinogen-deaminase. *Nucl. Acid Res.* **15**: 5955-5968.

Rossetti M. V. & Batlle A. (1977) Polypyrrol intermediates in porphyrin biosynthesis. Studies with *Euglena gracilis*. *Int. J. Biochem.* **8**: 277-283.

Rossetti M. V., Juknat A. & Batlle A. (1977) Porphyrin biosynthesis in *Euglena gracilis* II. Pyrrolymethane intermediates in the enzymic cyclotetramerization of porphobilinogen. *Int. J. Biochem.* **8**: 781-787.

Rossetti M. V., Juknat A., Kotler M., Fumagalli S. & Batlle A. (1980). 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.

Rossetti M.V., Juknat A., Araujo L., Lombardo M. E. & Batlle A. (1986) Porphyrin biosynthesis in *Euglena gracilis* -V: Soluble and particulate PBG-ase. *Comp. Biochem. Physiol.* **85B**: 451-458.

Rossetti M. V., Juknat A. & Batlle A. (1989) Soluble and particulate porphobilinogen deaminase from dark-grown *Euglena gracilis*. *Z. Naturforsch.* **44c**: 578-580.

Sancovich H, Batlle A & Grinstein M. (1969) Porphyrin biosynthesis. Separation and purification of PBG deaminase and Urogen III cosynthetase from cow liver. PBGase an allosteric enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **191**: 130-143.

Sancovich H., Ferramola A., Batlle A, Kivilevich A. & Grinstein M. (1976) Studies on cow liver porphobilinogen deaminase. *Acta Physiol. Latinoam.* **26**: 376-386.

Scott A., Clemens K., Stelowich N., Santander P., González M. & Roessner C. (1989). Reconstruction of apo-porphobilinogen deaminase: structural changes induced by cofactor binding. *FEBS Lett.* **242** (2): 319-324.

Sharif A., Smith A. & Abell C. (1989) Isolation and characterization of a cDNA clone for a chlorophyll synthesis enzyme from *Euglena gracilis*. The chloroplast enzyme hydroxymethylbilane synthase is synthesized with a very long transit peptide in *Euglena*. *Eur. J. Biochem.* **184**: 353-359.

Shioi Y., Nagamine N., Kuroki M. & Sassa T. (1980) Purification by affinity chromatography and properties of uroporphyrinogen I synthetase from *Chlorella regularis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **616**: 300-309.

Smythe E. & Williams D. (1988) A simple rapid purification scheme for hydroxymethylbilane synthase from human erythrocytes. *Biochem. J.* **251**: 237-241.

Stella A, Parera V, Llambías E & Batlle A. (1971) Pyrrolymethane intermediates in the synthesis of UroporphyrinogenIII by soybean callus porphobilinogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **252**: 481-488.

Stevens E, Frydman R & Frydman B. (1968) Separation of PBG deaminase and urogen III cosynthetase from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **158**: 496-498.

Stubnicer A., Picat C. & Grandchamp B. (1988) Rat porphobilinogen deaminase cDNA nucleotide. sequence of the erythropoietic form. *Nucleic Acids. Res.* **17** (7): 3102-3108.

Tephly T. (1975) Identification of a small molecular weight substance that protects uroporphyrinogen synthetase from the inhibition by lead, in Doss M & Nawrocki P (eds.), *Porphyrin in human Diseases Report of the Discussions*, 128-134.

Thomas S. & Jordan P. (1986) Nucleotide sequence of the hemC locus encoding porphobilinogen deaminase of *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acid Res.* **14**: 6215-6226.

Wang A., Arredondo-Vega F., Gianpietro P., Smith M., Anderson W. & Desnick R. (1981) Regional gene assignment of human PBG-D and esterase A4 to chromosome 11q23→11qter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 5734-5738.

Warren M. & Jordan P. (1988) Investigation into the nature of substrate binding to the dipyrromethane cofactor of *E. coli* porphobilinogen deaminase. *Am. Chem. Soc.* **27** (25): 9020-9030.

Williams D. (1984) Characterization of the multiple forms of hydroxymethylbilane synthase from rat spleen. *Biochem. J.* **217**: 675-683.

Williams D., Morgan G., Mc Donald E. & Battersby A. (1981) Purification of porphobilinogen deaminase from *Euglena gracilis* and studies of its kinetics. *Biochem. J.* **193**: 301-310.

Woodstock S. & Jordan P. (1994) Evidence of participation of aspartate-84 as a catalytic group at the active site of porphobilinogen deaminase obtained by site-directed mutagenesis of the *hemeC* gene from *Escherichia coli*. *Biochem.J.* **33**: 2688-2695.

CAPITULO III

Regulación y Porfirias

	Página
III.1. Regulación de la biosíntesis de porfirinas.....	50
III.1.1 Control por localización intracelular y tisular.....	51
III.1.2 Control por el efecto de constituyentes del medio ambiente o celular....	51
III.1.3 Control por su interconexión con otros caminos metabólicos.....	52
III.1.4 Control génico a través de cambios en la actividad y cantidad de enzima limitante.....	53
III.2. Porfirias.....	56
III.2.1 PBG-D y porfirias.....	57
III.3. Bibliografía.....	63

III. REGULACION Y PORFIRIAS

III.1. Regulación de la biosíntesis de porfirinas

Las porfirinas libres y sus precursores, ALA y PBG, no desempeñan otro papel fisiológico más que el de productos intermediarios en el camino metabólico del hemo. En condiciones normales no se produce acumulación de estos compuestos. Es entonces indudable que la biosíntesis de tetrapirroles es un proceso sujeto a una regulación muy eficiente.

Si estos mecanismos de control fallan o son defectuosos, la síntesis o acumulación de intermediarios puede alcanzar niveles mayores que los fisiológicos, provocando serias consecuencias al organismo.

La velocidad de funcionamiento de un camino metabólico depende de varios factores, tales como la cantidad y actividad de las enzimas involucradas, disponibilidad de sustratos y distribución celular de las distintas enzimas.

Se ha postulado que la célula dispone de múltiples mecanismos para regular la síntesis de tetrapirroles. Los actualmente aceptados son los siguientes:

- 1) Control por localización celular y tisular.
- 2) Control por efecto de los constituyentes del medio ambiente o del medio celular (oxígeno, luz, estado de óxido reducción).
- 3) Control por su interconexión con otros caminos metabólicos.
- 4) Control genético a través de cambios en la actividad y cantidad de la enzima limitante.

III.1.1 Control por localización intracelular y tisular

Teniendo en cuenta la localización intracelular de las distintas enzimas, se propuso un mecanismo de control de la biosíntesis de porfirinas, en el cual la permeabilidad de la membrana mitocondrial podría regular la concentración de los distintos sustratos en los sitios de reacción enzimática. Es notorio que determinadas etapas tengan lugar en las mitocondrias y otras en el citoplasma, de manera tal que los metabolitos formados deben difundir desde un compartimento a otro. Este proceso es en sí mismo un mecanismo regulatorio, especialmente si alguno de estos sustratos se encuentra en ciertas etapas unido a proteínas, con lo cual su difusión podría modificarse según el estado de la célula.

La maquinaria regulatoria de este camino está interconectada con otras vías metabólicas. La concentración estacionaria de ALA dentro de la mitocondria desempeña un papel relevante en la regulación de la biosíntesis de porfirinas, ya que determina la cantidad de este metabolito que debe ser transportada al citoplasma para la síntesis de PBG, pero a su vez los niveles de ALA mitocondrial están gobernados por la disponibilidad de succinil-CoA generado en el ciclo de ácidos tricarboxílicos.

III.1.2 Control por efecto de constituyentes del medio ambiente o celular

Distintos factores influyen sobre la biosíntesis de las porfirinas y sus precursores, siendo los más importantes la luz, la tensión de oxígeno y el contenido de ATP durante el crecimiento de los tejidos.

III.1.2.1 Oxígeno: Tanto la tensión de oxígeno como el estado de óxido-reducción de la célula influyen en distintas etapas de este camino y pueden jugar un papel regulatorio. Así por ejemplo, la conversión de coproporfinógeno a protoporfirinógeno es estrictamente aeróbica, mientras que la inserción de hierro en protoporfirina para formar el hemo, está favorecida por condiciones relativamente anaeróbicas.

III.1.2.2 Iluminación: En bacterias fotosintéticas, las condiciones de iluminación desempeñan también un papel importante en la regulación de la biosíntesis de tetrapirroles, ya que una muy elevada intensidad luminosa normalmente reprime su síntesis.

Las bacterias *Rp spheroides* crecidas aeróbicamente en oscuridad producen un bajo contenido de bacterioclorofila, pero estos organismos crecidos en anaerobiosis y luz son muy pigmentados. La síntesis de los pigmentos está controlada por el estado de óxido-reducción de alguno de los componentes de la cadena de transporte de electrones, el cual a su vez, estaría modificado por la presión parcial de oxígeno o por la intensidad de la luz, en anaerobiosis.

III.1.2.3 ATP: Se han obtenido resultados contradictorios respecto a la acción del ATP en la regulación de la síntesis de porfirinas. Por un lado se demostró que el agregado de ATP en el medio de crecimiento de *Rp. spheroides* inhibe significativamente la síntesis de porfirinas, posiblemente mediante la formación de un inhibidor de naturaleza proteica que actuaría inactivando a la enzima mitocondrial (Gajdos & Torok, 1969). Por otra parte, el ATP estimula la actividad del ALA-S citoplasmática de hígado de rata. En este caso se postula que el mismo se une a un sitio alostérico de esta enzima produciendo cambios conformacionales en los sitios de unión de los sustratos, de esta forma provocaría la activación de la enzima (Ohashi & Sinohara, 1978).

III.1.3 Control por su interconexión con otros caminos metabólicos

Ya se ha mencionado que existe una estrecha correlación entre la concentración de ALA intramitocondrial y los niveles de succinil-CoA generado por el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Piper *et al.*, 1973; Neuberger, 1980).

En ciertos organismos, la actividad de ALA-S está controlada por las actividades de las enzimas Cistationasa y Rodenasa. Estas enzimas están comprometidas en el

metabolismo de compuestos sulfurados, así mismo como en la formación y degradación de una trisulfocistina que actúa como activador del ALA-S (Vázquez *et al.*, 1980; Vázquez, 1984).

III.1.4 Control génico a través de cambios en la actividad y cantidad de enzima limitante

Como ya se mencionó en el Capítulo I, la síntesis de porfirinas está controlada principalmente por cambios en la actividad del ALA-S. Dado que esta enzima presenta una baja afinidad por la glicina (K_m : 5-20 mM) y que los niveles intracelulares de este aminoácido son de aproximadamente 1 mM, se propuso que la concentración de este sustrato sería un factor limitante para la actividad del ALA-S (Neuberger, 1980). Esta hipótesis se reforzó cuando se suministró ácido p-aminobenzoico o benzoato de sodio (compuestos que forman complejos conjugados con la glicina) a ratas tratadas con 3,5-dicarbetoxy-1,4-dihidrocolidina (DDC), droga que induce la actividad del ALA-S. En este caso se observó una reversión de los efectos bioquímicos provocados por la droga porfirinogénica (Piper *et al.*, 1973). En algunas fuentes también se demostró inhibición del ALA-S por su producto (Lascelles, 1959).

En muchos procesos enzimáticos, el producto final de una dada secuencia metabólica ejerce un efecto inhibitorio sobre la primera enzima de ese camino. Este mecanismo se conoce como “*feed back*” o retroalimentación. Se demostró que este tipo de control tiene lugar en la biosíntesis de porfirinas (Lascelles, 1964; Marks, 1969). Cuando la concentración de hemo en la célula supera los niveles normales, éste inhibe directamente la primera enzima del camino. Por otro lado el ALA-S responde rápidamente cuando la célula requiere una mayor síntesis de hemo.

El hemo como represor puede actuar a nivel de transcripción (Srivastava *et al.*, 1988), traducción (Yamamoto *et al.*, 1983) y translocación de la enzima desde el citosol hacia la mitocondria (Hayashi *et al.*, 1983).

El mecanismo que se ha postulado para explicar la formación y control del ALA-S se basa en la conocida hipótesis de Jacob y Monod (Figura I-III.1). En la mayoría de los tejidos la síntesis de hemo se encuentra normalmente reprimida y el mismo hemo actúa como represor de su propia síntesis.

El control que ejerce el hemo sobre el ALA-S es muy importante a nivel de la síntesis *de novo*. Por otro lado, debe tenerse en cuenta la retroinhibición por producto final, ya que el hemo se sintetiza en el mismo compartimento donde el ALA-S desarrolla su actividad catalítica (Wolfson *et al.*, 1979).

Este tipo de control se explica asumiendo la existencia de un “*pool*” o reservorio de hemo libre ubicado en el citosol y con propiedades regulatorias. Se postula que dicho “*pool*” está formado por hemo recién sintetizado o bien por el liberado por las hemoproteínas. Debe ser pequeño y poseer una elevada velocidad de recambio (Moore & Disler, 1985).

III.2. Porfirias

Se denominan Porfirias a un conjunto de enfermedades que surgen como consecuencia de disturbios en el camino metabólico del hemo. Estas patologías pueden ser hereditarias o adquiridas y se caracterizan por aumento en la producción y excreción de porfirinas y/o precursores.

Tradicionalmente se las clasificaba de acuerdo con las manifestaciones clínicas en cutáneas o agudas, o bien en hepáticas o eritropoyéticas según el error metabólico se exprese fundamentalmente en hígado o en médula ósea. En la actualidad esta clasificación resulta insuficiente, ya que se conocen casos en los cuales hay participación clínica evidente de ambos órganos.

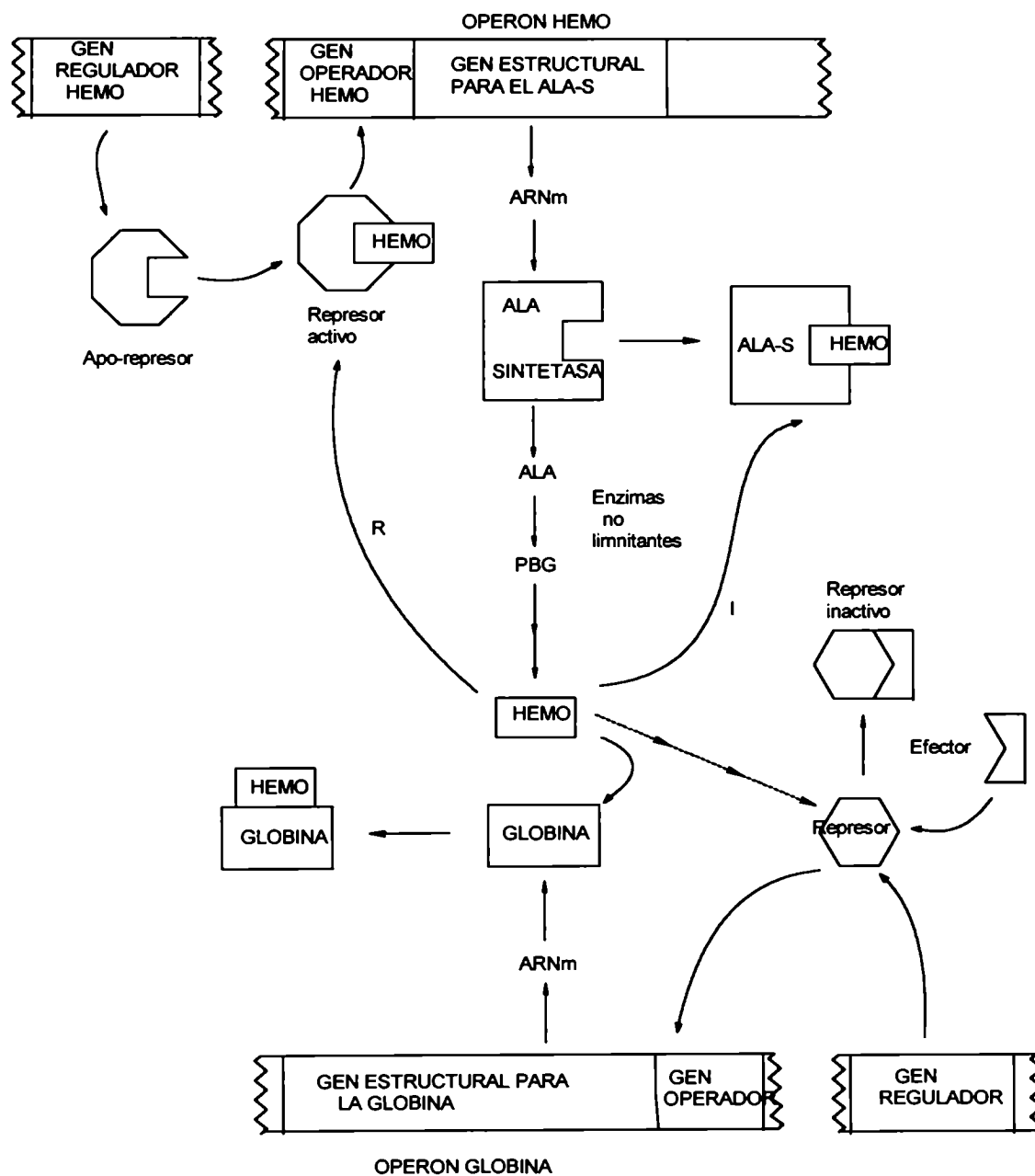


Figura I-III.1: Mecanismo de regulación de la biosíntesis del hemo.
 I: por inhibición *feed-back* del ALA-S.
 R: por represión de la síntesis proteica del ALA-S.

Moore *et al.* (1987) proponen la siguiente clasificación:

Hepáticas

Porfiria aguda intermitente (PAI)

Porfiria deficiente en ALA-D (PALADd)

Porfiria variegata (PV)

Coproporfiria hereditaria (CPH)

Porfiria cutánea tarda (PCT)

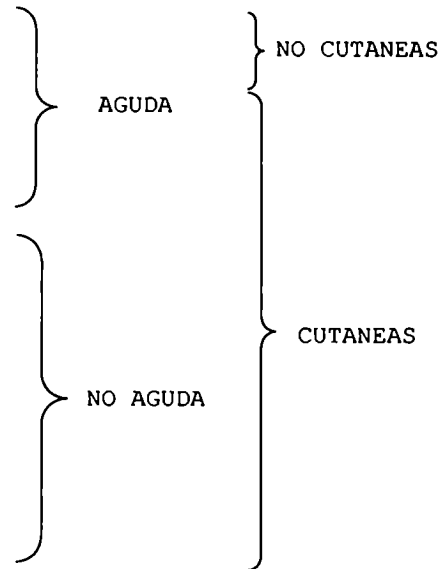
Eritropoyéticas

Protoporfiria eritropoyética (PPE)

Porfiria congenita eritropoyética (PCE)

Hepato-eritropoyética

Porfiria hepato-eritropoyética (PHE)



Mientras que la sobreproducción de porfirinas es responsable de la sensibilidad a la luz en las Porfirias Cutáneas, valores elevados de ALA y PBG dan origen a los típicos ataques agudos con dolores abdominales, cefaleas, vómitos, parálisis y manifestaciones psiquiátricas en las Porfirias Agudas.

Excepto la PCE y la NPA, que lo hacen como un mendeliano recesivo y la PCT que puede existir en dos formas, hereditaria (dominante) o adquirida, las demás porfirias se heredan con un carácter autosómico dominante. La PCT está generalmente asociada a la exposición de agentes químicos inductores, en especial hidrocarburos polihalogenados, y también puede estar relacionada con neoplasias hepáticas.

Cabe señalar que además de la falla enzimática que caracteriza a cada porfiria, debemos tener presente la desregulación del ALA-S y su aumento de actividad secundario como consecuencia de una menor síntesis de hemo.

III.2.1 PBG-D y porfirias

La porfiria aguda intermitente (PAI) está asociada a una disminución de la actividad de la PBG-D. Como resultado de esta falla primaria, disminuye la velocidad de síntesis de hemo, que como ya se ha discutido regula la actividad de la primera enzima del camino a través de mecanismos de retroinhibición y represión, de esta manera tiene lugar un aumento secundario de la actividad del ALA-S, que conduce a la acumulación y aumento de la excreción urinaria de los precursores ALA y PBG.

El diagnóstico clínico de esta enfermedad se basa en la determinación de la actividad de PBG-D eritrocitaria. En los portadores latentes la actividad de esta enzima está reducida en un 50% con respecto a los valores hallados en individuos normales (Strand *et al.*, 1972).

Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad se pueden clasificar en tres categorías:

- 1) síntomas gastrointestinales
- 2) disturbios cardiovasculares
- 3) manifestaciones neurológicas.

1) El ataque agudo se caracteriza por presentar intensos dolores epigástricos, crecientes con el tiempo, continuos o con exacerbaciones y períodos de calma. Estos pueden estar acompañados por vómitos, náusea y constipación.

2) Durante la fase aguda de la enfermedad el individuo manifiesta taquicardia e hipertensión; esta última puede persistir aún entre ataques. En ocasiones se encuentran áreas de vasodilatación y vasoconstricción en extremidades y fondo de ojo.

3) Los síntomas neurológicos y psicológicos son los predominantes. El paciente padece excitación, ansiedad, depresión, alucinaciones visuales y auditivas, esquizofrenia

e insomnio. Pueden aparecer fenómenos motores con paresias o parálisis de los miembros inferiores o superiores, laríngeas y deglutorias. La complicación más importante es la insuficiencia respiratoria. Hay deterioro sensorial del tipo analgésico. Los enfermos pueden presentar ataques epilépticos de origen desconocido. Debido al daño hipotalámico hay un exagerado pasaje de la hormona antidiurética a la circulación. Como consecuencia de ello hay retención de agua e hiponatremia.

Se han postulado diversas hipótesis para explicar las características clínicas y bioquímicas de esta patología (Yeung Laiwah *et al.*, 1987). Todas ellas tienen en común una base neurogénica:

- 1) Las manifestaciones neurológicas surgen de la disminución de sustratos o cofactores esenciales que se produce como consecuencia del defecto en el camino metabólico del hemo.
- 2) Las neuropatías son el resultado de la formación de productos derivados de los precursores de porfirinas.
- 3) Las manifestaciones clínicas se deben a la neurotoxicidad de los precursores ALA y PBG.
- 4) Las manifestaciones neurológicas son el resultado de la deficiencia del contenido de hemo en el tejido nervioso.
- 5) El ALA actúa como generador de especies reactivas de oxígeno (ROS).

En la actualidad se considera que las hipótesis 3, 4 y 5 son las que guardan más fundamento.

Durante el ataque agudo tiene lugar un aumento de la excreción urinaria de los precursores ALA y PBG, que está relacionado con la sobreproducción hepática de los

mismos. Para que estos precursores puedan ejercer su efecto neurotóxico deben atravesar la barrera hematoencefálica. Se determinó que durante el ataque agudo, el ALA cruza esta barrera (Mc Gillion *et al.*, 1974). Por otra parte existe la posibilidad de que la neurotoxicidad del ALA y el PBG se deba a un aumento de su síntesis en el mismo sistema nervioso. Cuando se midió la actividad de ALA-S en cerebro de rata (Gibson & Goldberg, 1970; Barnes *et al.*, 1971; Maines, 1980) se encontró que es muy baja con respecto a las otras enzimas de este camino metabólico. Esto sugiere que tanto en el cerebro como en el hígado la velocidad de formación de hemo está controlada por la producción de ALA.

Las manifestaciones neurológicas típicas de la PAI también se han observado en pacientes con saturnismo o tirosinemia hereditaria, patologías en las que hay sobreproducción de ALA pero no de PBG (Doss, 1979). Por tal motivo se le asigna al ALA un rol neurotóxico más importante que al PBG.

Se determinó que el ALA disminuye la tonicidad muscular del duodeno aislado de conejo (Cutler *et al.*, 1980).

El ALA interfiere en la liberación de neurotransmisores tales como la acetilcolina (Feldman *et al.*, 1968).

El ácido γ -aminobutírico (GABA) está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y actúa como neurotransmisor inhibitorio. La semejanza estructural del ALA y el GABA (Figura I-III.2) sugiere que muchos de los signos neurológicos que se presentan en la PAI se deban a que el ALA inhibe la unión del GABA a su receptor (Bonkowsky & Schady, 1982).

Estas observaciones no permiten explicar cambios neuropatológicos tales como la degeneración axonal y desmielinización que se presentan en la PAI y en la intoxicación con plomo (Kappas *et al.*, 1983). Por otra parte en estas patologías también se observan daños en los hepatocitos a nivel del retículo endoplasmático y de las mitocondrias

(Biempica *et al.*, 1974), así como una disminución de la función mitocondrial de las células renales. Hermes-Lima *et al.* (1991) establecen que a pH fisiológico el ALA puede generar especies reactivas de oxígeno (Figura I-III.3), éstas interactúan con biomoléculas causando daños a nivel celular.

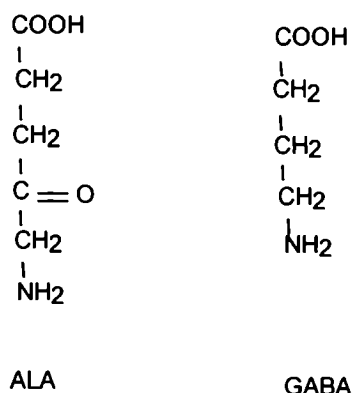


Figura I-III.2: Semejanza estructural entre el ácido δ -aminolevúlico (ALA) y el γ -aminobutírico (GABA).

En nuestro laboratorio se ha caracterizado el transporte del ALA en dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (Bermúdez Moretti *et al.*, 1993, 1995). El mismo es unidireccional, interviene sólo un sistema activo y no está mediado por la permeasa general de aminoácidos (GAP). La actividad de este sistema depende de la concentración externa de hidrógeno, así como del pool interno de ALA y GABA.

Una de las características de esta patología es que el individuo porfírico puede llevar una vida normal sin experimentar jamás un ataque agudo. El mismo puede desencadenarse frente a algún agente precipitante. Dentro de los factores que pueden provocar una crisis aguda se encuentran ciertas drogas, por ejemplo los barbituratos, el alcohol y las sulfonamidas, además del ayuno, la dieta y la acción de algunas hormonas (el embarazo y los anticonceptivos orales pueden ser inductores).

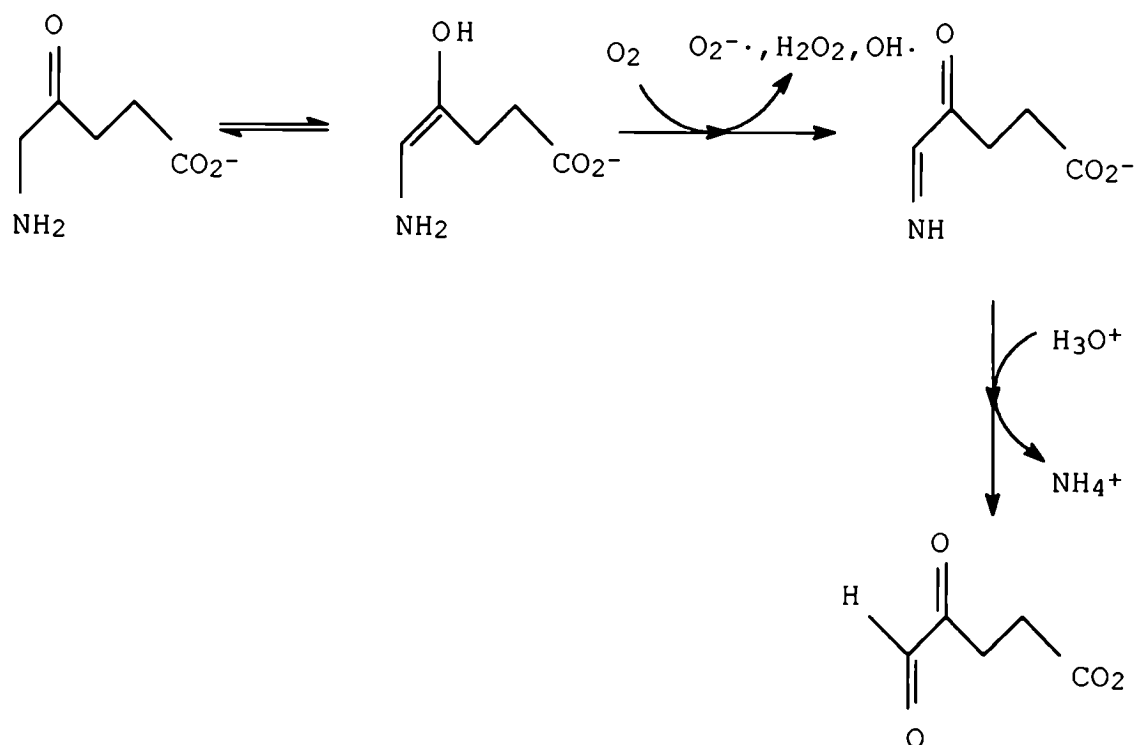


Figura I-III.3: Generación de especies reactivas de oxígeno a partir del ALA.

Se han desarrollado tratamientos específicos para resolver el ataque agudo. Todos ellos actúan directamente sobre el camino del hemo y de esta forma controlan los desequilibrios producidos por la acumulación de precursores. Entre los mismos se encuentran la administración de ácido fólico en combinación con carbohidratos y otras vitaminas (Batlle, 1986), administración de altas dosis de carbohidratos (Stein & Tschudy, 1970) y de hematina (Bonkowsky *et al.*, 1971).

III.3. Bibliografía

Barnes R., Jones M., Jones O. & Porra R. (1971) Ferrochelatase and 5-aminolaevulate synthase in brain, heart, kidney and liver of normal and porphyric rats. *Biochem J.* **124**: 633-637.

Batlle A. (1986) Tetrapyrrol biosynthesis. *Semin. Dermatol.* **5**: 70-87.

Bermúdez Moretti M., Correa García S., Stella C., Ramos E., & Batlle A. (1993) δ -aminolevulinic acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Biochem.* **25**: 1917-1924.

Bermúdez Moretti M., Correa García S., Chianelli M., Ramos E., Mattoon J. & Batlle A. (1995) Evidence that 4-aminobutyric acid and 5-aminolevulinic acid share a common transport system into *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Biochem.* **27**: 169-173.

Biempica L., Kosower N., Ma M. & Goldfischer S. (1974) Hepatic porphyrias. Cytochemical and ultrastructural studies of liver in acute intermittent porphyria and porphyria cutanea tarda. *Arch. Pathol.* **98**: 336-343.

Bonkowsky H. & Schady W. (1982) Neurologic manifestations of acute porphyria. *Sem. Liver Dis.* **2**: 108-124.

Bonkowsky H., Tschudy D. & Collins A. (1971) Repression of the overproduction of porphyrin precursors in acute intermittent porphyria by intravenous infusions of haematin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 2725-2729.

Cutler M., Moore M. & Dick M. (1980) Effects of 5-aminolaevulinic acid on contractive activity of rabbit duodenum. *Eur. J. Pharmacol.* **64**: 221-230.

Doss M. (1979) Was ist gesichert in der Therapie der Porphyrrien?. *Internist* **18**: 664-667.

Feldman D., Levere R. & Lieberman J. (1968) Presynaptic neuromuscular inhibition by delta-aminolevulinic acid, a porphyrin precursor. *Trans. Am. Neurol. Assoc.* **93**: 206-208.

Gajdos A. & Török M. (1969) The quantitative regulation of the biosynthesis of porphyrins by intracellular ATP concentration. *Biochem Med.* **2**: 372-388.

Gibson S. & Goldberg A. (1970) Defects in haem synthesis in mammalian tissues in experimental lead poisoning and experimental porphyria. *Clin. Sci.* **38**: 38.

Hayashi N., Watanabe N. & Kikuchi G. (1983) Inhibition by hemin of in vivo translocation of chicken liver 5-aminolaevulinate synthase into mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **115**: 700-706.

Hermes Lima M., Valle V., Vercesi A. & Bechara E. (1991) Damage to rat liver mitochondria promoted by 5-aminolevulinic acid generated reactive oxygen species: connections with acute intermittent porphyria and lead poisoning. *Biochim. Biophys. Acta* **1056**: 57-63.

Kappas A., Sassa S. & Anderson K. (1983) The Porphyrrias en Stanbury J B, Wyngaarden J B, Fredrickson DS, eds. *The metabolic basis of inherited diseases*. New York; Mc Graw Hill, 1301-1384.

Lascelles J. (1959) Adaptation to form bacteriochlorophyll in *Rh. Spheroides*. Changes in activity in enzymes concerned in pyrrol biosynthesis. *Biochem. J.* **72**: 508-518.

Lascelles J. (1964) Tetrapyrrole biosynthesis and its regulation. W. A. Benjamin, Inc., New York, Amsterdam.

Maines M. (1980) Regional distribution of the enzymes of haem biosynthesis and the inhibition of 5-aminolaevulinate synthase by manganese in the rat brain. *Biochem. J.* **190**: 315-321.

Marks G. (1969) Heme and chlorophyll. Chemical Biochemical and Medical Aspects. D. van Nostrand Co Ltd, London.

Mc Gillion F., Thompson G., Moore M. & Goldberg A. (1974) The passage of 5-aminolevulinic acid across the blood-brain barrier of the rat: effect of ethanol. *Biochem. Pharmacol.* **23**: 472-474.

Moore M. & Disler P. (1985) Biochemical diagnosis of the porphyrias. *Clin. Dermatol.* **3**: 24-40.

Moore M., Mc Coll K., Rimington C. & Goldberg A. (1987) Porphyrins and enzymes of the heme biosynthetic pathway in *Disorders of porphyrin metabolism*. Plenum, New York.

Neuberger A. (1980) The regulation of chlorophyll and porphyrin biosynthesis. *Int. J. Biochem.* **12**: 787-789.

Ohashi A. & Sinohara T. (1978) Stimulation by ATP of cytosol-type ALA-synthetase of rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **80**: 370-374.

Piper W., Condie I & Tephly T. (1973) The role of substrates for glycine acyltransferase in the reversal of chemically induced porphyria in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**: 671-677.

Srivastava G., Borthwick I., Maguire D., Elferink C., Bawden M., Mercer J. & May B. (1988) Regulation of 5-aminolevulinate synthase mRNA in different tissues. *J. Biol. Chem.* **263**: 5202-5207.

Stein J. & Tschudy D. (1970) Acute intermittent porphyria. A clinical and biochemical study of 46 patients. *Medicine* **49**: 1-16.

Strand L., Meyer V. & Felsher B. (1972) Decreased red cell uroporphyrinogen I synthetase activity in intermittent acute porphyria. *J. Clin. Invest.* **51**: 2530-2536.

Vazquez E., Wider de Xifra E. & Batlle A. (1980) Porphyrin biosynthesis in soybean callus tissue system XVIII. Levels of succinyl CoA synthetase, cystathionase, rhodanese: an explanation for increased δ -aminolaevulinate dehydratase in clones of different age. *Int. J. Biochem.* **12**: 721-724.

Vazquez E. (1984) *Investigación de los niveles de enzimas relacionadas con la biosíntesis de tetrapirroles en modelos vegetales y en individuos normales y porfíricos*. Tesis Doctoral. FCEyN/UBA.

Wolfson S., Bartcsak A. & Bloomer J. (1979) Effect of endogenous heme generation on 5-aminolevulinic acid synthase activity in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **254**: 3543-3549.

Yamamoto M., Hayashi N. & Kikuchi G. (1983) Evidence for the transcriptional inhibition by heme of the synthesis of 5-aminolevulinate synthetase in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **105**: 985-991.

Yeung Laiwah A., Moore M. & Goldberg A. (1987) Pathogenesis of acute porphyria. *Quarterly Journal of Medicine* **241**: 377-392.

CAPITULO IV

El riñón y los mecanismos de la porfiria renal

	Página
IV.1. Introducción.....	66
IV.2. Anatomía funcional del riñón.....	67
IV.3. La función renal.....	70
IV.4. Mecanismos de la porfiria renal.....	72
IV.4.1 Porfiria renal inducida por trazas de metales.....	72
IV.4.2 Porfiria renal inducida por hidrocarburos halogenados.....	75
IV.4.3 Aporte del riñón a las manifestaciones clínicas de las porfirias humanas.....	76
IV.5. Bibliografía.....	78

IV. EL RIÑÓN Y LOS MECANISMOS DE LA PORFIRIA RENAL

IV.1. Introducción

El riñón es un órgano excretor y regulador. Cumplen diversas funciones tales como:

1. Regulación del equilibrio de electrolitos
2. Regulación del equilibrio ácido-base
3. Excreción de productos metabólicos y de xenobióticos
4. Producción y secreción de hormonas
5. Control del volumen de fluidos corporales.

El riñón desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la constancia del medio interno. Esta función se cumple fundamentalmente, mediante la regulación del contenido acuoso del organismo, proceso en el cual contribuye la hormona antidiurética (HAD) secretada por el sistema hipotálamo-neurohipófisis. El mecanismo de control se relaciona estrechamente con el mantenimiento de un equilibrio electrolítico adecuado, es decir con el balance de los iones sodio, potasio, calcio, cloruro, fosfato, bicarbonato y sulfato. La regulación renal del equilibrio ácido-base es importante para que el equilibrio electrolítico sea el adecuado. Los procesos de excreción renal dependen de un mecanismo de intercambio iónico, mediante el cual se secretan protones en reemplazo de sodio, y se produce una acidificación de la orina. Por otra parte, el amoníaco, producido por el riñón, sustituye a las bases; en consecuencia la regulación renal del equilibrio ácido-base constituye un mecanismo conservador de bases.

El riñón también cumple la función de excretar productos de desecho, como la urea, el ácido úrico, la creatinina y la creatina, al mismo tiempo reabsorbe compuestos tales como la glucosa y los aminoácidos.

Otras funciones incluyen los procesos de detoxificación mediante el mecanismo de conjugación, por ejemplo, la conjugación de la glicina con el ácido benzoico para formar ácido hipúrico que se excreta rápidamente.

IV.2. Anatomía funcional del riñón

El riñón está constituido por una cápsula de tejido conjuntivo denso, una zona cortical y una zona medular.

La zona medular está formada por estructuras cónicas o piramidales denominadas pirámides de Malpighi, cuyas bases y lados están en contacto con la sustancia cortical y sus vértices hacen prominencias, denominadas papilas, hacia los cálices renales (Figura I-V-1).

De la base de las pirámides de Malpighi parten formaciones alargadas que penetran en la zona cortical, recibiendo el nombre de radios medulares.

La zona cortical es continua y ocupa el espacio dejado por las pirámides de Malpighi, principalmente el comprendido entre éstas y la cápsula que recubre el lado convexo del riñón.

La orina excretada por el riñón pasa por los uréteres a la vejiga y se elimina al exterior por la uretra.

La unidad estructural y funcional del riñón se denomina nefrón. Está formado por una parte dilatada, el corpúsculo de Malpighi, por el túbulo contorneado proximal, por los segmentos delgado y grueso del asa de Henle y por el túbulo contorneado distal (Figura I-IV-2).

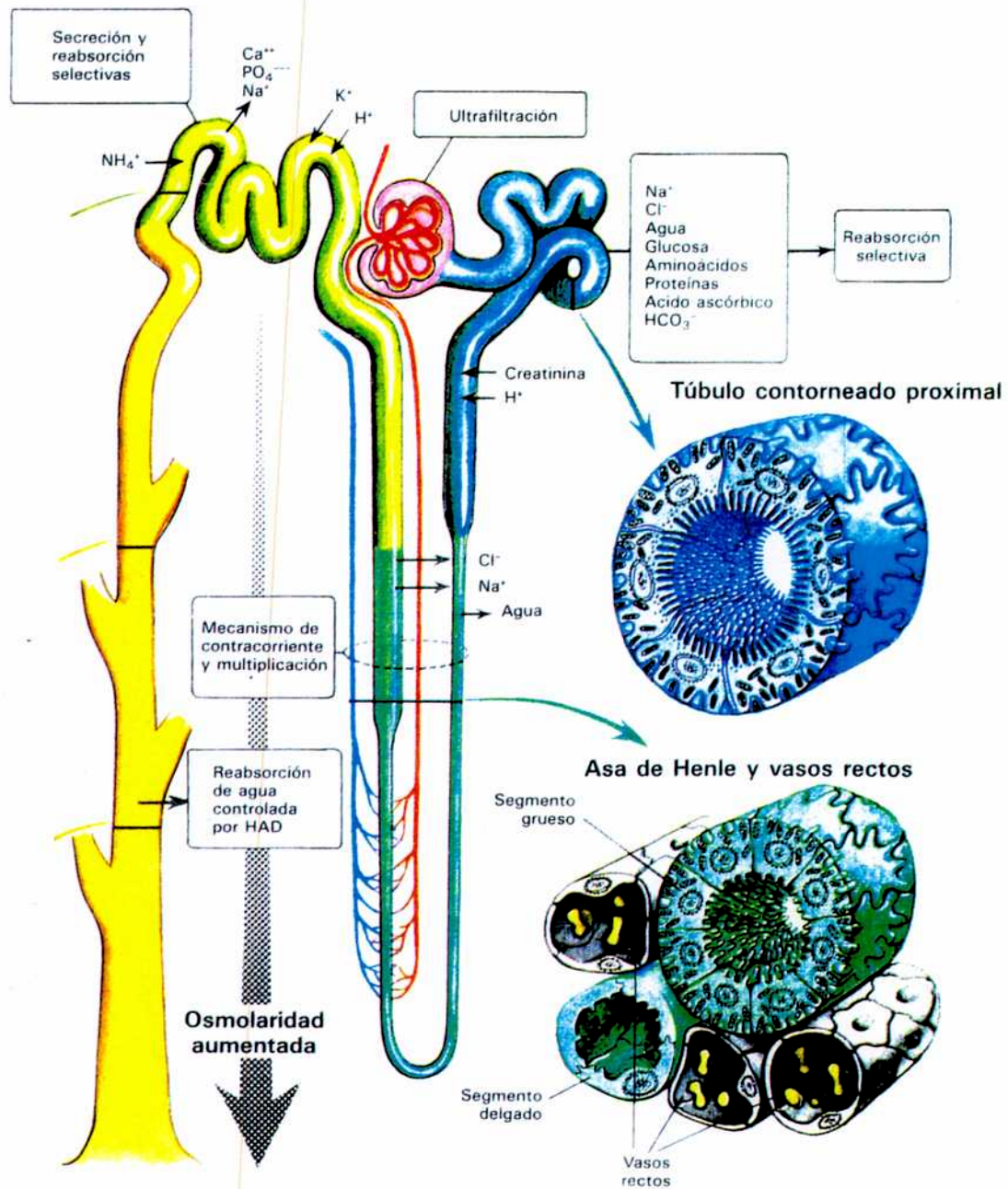


Figura I-IV.2: Estructura del nefrón.

Los componentes del nefrón están recubiertos por una lámina basal que se prolonga con el escaso tejido conectivo del riñón.

Los corpúsculos de Malpighi y los túbulos de trayecto tortuoso (túbulos contorneados proximal y distal) son corticales, mientras que los dos segmentos del asa de Henle son rectilíneos y se localizan en la médula.

El corpúsculo de Malpighi está formado por un ovillo de capilares (glomérulo) envueltos por la cápsula de Bowman. El túbulo contorneado proximal comprende una parte inicial contigua al corpúsculo de Malpighi y una parte rectilínea que penetra en la zona medular mediante una extensión muy corta, continuándose con el segmento delgado del asa de Henle, el cual tiene forma de U, con un brazo delgado y otro grueso. En las asas largas, la curvatura está siempre en el segmento delgado, en cambio en las cortas se localiza en el segmento grueso. Por consiguiente, la mayor porción de segmento delgado es descendente y la mayor porción de la parte gruesa es ascendente. La estructura de la porción delgada es semejante a los capilares sanguíneos, con los cuales puede ser confundida. Cuando la porción gruesa de esta sección del nefrón penetra en la zona cortical, conserva la misma estructura histológica; sin embargo, se vuelve tortuosa y se denomina túbulo contorneado distal que es el último segmento del nefrón. La orina pasa de los túbulos contorneados distales a los túbulos colectores que en la médula se unen unos a otros, formando tubos cada vez más grandes que se dirigen hacia las papilas.

IV.3. La función renal

El riñón regula la composición química del medio interno por un proceso múltiple que comprende: filtración, absorción activa, absorción pasiva y secreción.

La filtración se realiza en el glomérulo, donde se forma un filtrado del plasma sanguíneo. Los túbulos del nefrón absorben las sustancias que todavía son útiles para

mantener la constancia del medio interno y el metabolismo. Además, transfieren ciertas sustancias de la sangre hacia la luz tubular, las cuales son adicionadas a la orina y eliminadas con ella. Los túbulos colectores absorben agua, contribuyendo a la concentración de la orina, que en general es hipertónica en relación con el plasma sanguíneo. Por medio de este proceso, el organismo controla la cantidad de agua y el equilibrio osmótico. La filtración glomerular tiene lugar gracias a la presión hidrostática de la sangre. El filtrado tiene composición semejante a la del plasma sanguíneo, pero apenas contiene proteínas ya que las macromoléculas no atraviesan la pared de los capilares. La albúmina plasmática de peso molecular 70000 Da aparece en mínima cantidad. El filtrado glomerular formado en el corpúsculo de Malpighi pasa al túbulo contorneado proximal y es ahí donde comienzan los procesos de reabsorción y excreción. En este segmento del nefrón se absorbe toda la glucosa y gran parte del NaCl y del agua del filtrado. Mientras que la glucosa y el Na⁺ son absorbidos por las células tubulares por un proceso activo, el agua y el Cl⁻ difunden pasivamente, a fin de mantener el equilibrio osmótico. El túbulo contorneado proximal absorbe también por proceso activo la totalidad de los aminoácidos, de las proteínas y del ácido ascórbico contenidos en el filtrado. El asa de Henle es responsable de la formación de orina hipertónica. La porción descendente es muy permeable, permitiendo el libre paso de Na⁺ y agua. Como el líquido intersticial de la zona medular del riñón es hipertónico, en la porción descendente del asa de Henle entra Na⁺ y sale agua del filtrado glomerular. La porción ascendente es impermeable al agua y muy activa en el transporte de sodio hacia el líquido intersticial. Como consecuencia de la salida de Na⁺, el líquido que llega al túbulo contorneado distal es hipotónico. Aquí se produce una salida de Na⁺ mediada por un proceso activo y generalmente también de agua. En la salida de agua participa la hormona antidiurética de la neurohipófisis. El exceso de agua en la sangre inhibe la producción de HAD y, en ausencia de esta hormona, el túbulo distal es impermeable al agua formándose entonces una orina más diluida. En esta sección del nefrón se añaden H⁺ y amoníaco al filtrado glomerular, contribuyendo de esta forma al equilibrio ácido-base de la sangre.

Aunque no forma parte del nefrón, el tubo colector influye en la composición de la orina por ser el lugar donde se realiza el ajuste final de la cantidad de agua en la misma. Esto es de gran importancia para el mantenimiento del equilibrio hídrico de la sangre.

IV.4. Mecanismos de la porfiria renal

Existen trabajos que sustentan la idea que el riñón es la principal fuente de porfirinas urinarias en individuos porfíricos y normales (Woods, 1988). Si bien muchos autores consideran que la etiología de esta patología es hepática, los estudios de Wood sugieren que el riñón sería el principal responsable de las manifestaciones clínicas que aparecen en estos desórdenes metabólicos.

IV.4.1 Porfiria renal inducida por trazas de metales

En experiencias realizadas con el objeto de elucidar la etiología de la coproporfinuria inducida en ratas por exposición al plomo y al mercurio, se comprobó por un lado que solamente había niveles elevados de porfirinas en el riñón, mientras que la concentración de estos tetrapirroles en plasma, que se considera indicativa de una porfiria hepática, era normal (Day *et al.*, 1980). Trabajando con conejos intoxicados con plomo se concluyó que el riñón es la principal fuente del PBG excretado por la orina (Kreimer-Birnbaum & Grinstein, 1965). Posteriormente se demostró que los niveles elevados de coproporfirina urinaria excretada por pacientes con saturnismo eran también de origen renal (Martasek *et al.*, 1982).

Para estudiar el desarrollo de la porfirinuria inducida por el mercurio en ratas, se les administró hidróxido de metil mercurio (HMM) en el agua de bebida en distintas dosis y durante distintos tiempos (Woods & Fowler, 1977; Woods & Fowler, 1987). Ratas expuestas a 3, 5 ó 10 ppm de HMM durante 6 semanas, manifestaron una

porfirinuria caracterizada por un aumento de 12 a 20 veces de la concentración urinaria de uro- y coproporfirina respecto a los controles. Evidencias bioquímicas indicaron que la etiología era enteramente renal (Woods, 1988).

Estas experiencias permitieron concluir que en la porfiria inducida por mercurio están involucrados tres eventos bioquímicos. Estos son:

- (1) Alteración del metabolismo renal de la porfiria, fundamentalmente a nivel de la URO-D y CPG-asa.
- (2) Disminución del contenido de hemo en la célula renal.
- (3) Desregulación del ALA-S renal.

Estos eventos ocurren progresivamente durante la exposición al HMM y las manifestaciones se evidencian luego de 1 semana de haber comenzado la intoxicación. Por otro lado este proceso está favorecido por el hecho de que los metales inducen la disminución del contenido celular de glutatión y la oxidación de porfirinógenos a porfirinas (Woods, 1988).

Experiencias realizadas *in vitro* muestran que la URO-D renal es más susceptible a la inhibición por mercurio que la misma enzima hepática (Woods *et al.* 1984). Es necesaria una concentración de 10 μM de Hg^{++} en la mezcla de reacción para inhibir la decarboxilación enzimática a hexaporfirinógenos, mientras que la inhibición a heptaporfirinógenos no se alcanza si la concentración del metal es inferior a 100 μM . Este comportamiento diferencial de los sitios catalíticos frente al mercurio es consistente con el aumento en la excreción de porfirinas octo- y heptacarboxiladas en la orina durante la exposición a este metal. Concentraciones de Hg^{++} superiores a 1000 μM inhiben la URO-D *in vitro*. El riñón es el principal órgano blanco para el mercurio. Esto explica el aumento en la excreción de porfirinas altamente carboxiladas luego de iniciada la exposición a este tóxico (Woods *et al.*, 1984).

La inhibición de la CPG-asa también contribuye a la porfirinuria que se manifiesta como consecuencia de la intoxicación mercúrica. La disminución de la actividad de esta enzima está relacionada con un aumento en la excreción urinaria de coproporfirina. Cuando se trabajó con ratas, a las cuales se les administró 10 ppm de HMM en el agua de bebida durante 6 semanas, se observó una disminución de 56% de la actividad respecto a los controles. Concomitantemente los valores de coproporfirina en orina aumentaron 5 veces respecto al lote de ratas no intoxicadas. La ferroquelatasa también muestra una inhibición similar en este caso (Woods, 1979). En contraste no hay inhibición significativa de la CPG-asa y ferroquelatasa hepáticas por mercurio.

El aumento de la actividad del ALA-S renal, que se produce durante la exposición al HMM, contribuye a la sobreproducción de porfirinas octocarboxiladas (Woods & Fowler, 1977; 1987). Esta observación sustenta la idea que la desregulación del ALA-S ante una deficiencia de hemo tiene lugar en las células renales mediante un mecanismo similar al que se observa en los hepatocitos. Este aumento de actividad del ALA-S se produce luego de varias semanas de haber iniciado la intoxicación y está precedido por una inhibición del 50% respecto a los controles (Woods & Fowler, 1987). Este tipo de respuesta guarda semejanza con la observada en el hígado, la única diferencia estriba en el hecho que la respuesta hepática es más rápida, tiene lugar en horas y no semanas después de haber iniciado el tratamiento (Maines, 1977; 1983).

Se administró hemina (50 mg/kg, IP) a ratas intoxicadas con mercurio 4 horas antes del sacrificio. En este caso se observó que la actividad de ALA-S disminuyó a valores, que en algunos casos resultaron ser menores a los controles (Woods, 1988). Esta experiencia demuestra que la derrepresión del ALA-S tiene lugar merced a una disminución del contenido de hemo.

El patrón de excreción de porfirinas urinarias en esta intoxicación, con un aumento de las porfirinas octo- hepta y tetracarboxiladas, es característico y se diferencia de las porfirinurias provocadas por otros metales (Fowler *et al.*, 1987). Ya que el mecanismo de porfiria renal inducida por el mercurio es conocido, el perfil de porfirinas

excretadas por la orina se emplea como monitor biológico para la exposición ocupacional de individuos a los vapores de este contaminante (Woods, 1979; 1981).

IV.4.2 Porfiria renal inducida por hidrocarburos halogenados

Es conocido el hecho que varios hidrocarburos halogenados inducen porfiria renal actuando sobre la biosíntesis de porfirinas o bien sobre el contenido celular de hemo. Ratas tratadas con hexaclorobenceno (HCB) acumularon grandes cantidades de porfirinas en las células epiteliales del túbulo proximal y del asa de Henle (Ivanov *et al.*, 1976). Curiosamente en este trabajo se consideró que estas porfirinas eran de origen hepático, sin haber medido las enzimas del camino biosintético ni en hígado ni en riñón, ni tampoco la concentración de porfirinas plasmáticas y hepáticas. Sin embargo, otro grupo de trabajo demostró que cuando se intoxican ratas con HCB, la actividad de la URO-D renal disminuye significativamente (Blekkenhorst *et al.*, 1980).

Miranda *et al.* (1986) obtuvieron inducción de porfiria en codornices intoxicadas oralmente con Arochlor 1254 (500 mg/kg). Estos autores observaron una marcada acumulación de porfirinas en el riñón respecto a los controles (1709 veces expresado como μg de porfirinas/g de tejido). Conjuntamente se produjo un aumento de la actividad del ALA-S (11 veces) y una disminución del 51% de la actividad de la URO-D renales. Curiosamente, la actividad de esta última enzima en hígado no estaba afectada. No resulta claro en este estudio si el efecto tóxico se debe únicamente al Arochlor o si los contaminantes que normalmente lo acompañan (policloro bencenos y dibenzofuranos) son responsables de su acción. Sin embargo resultan interesantes los resultados de Fowler *et al.* (1977) respecto a la acción de la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-dioxina. Este es un potente compuesto porfirinogénico y un inductor de las oxidasas de función mixta hepáticas. Este tóxico indujo al sistema microsomal renal, localizándose su acción predominantemente en las células del túbulo proximal. Dado que el riñón desarrolla los mismos procesos oxidativos de función mixta que se han propuesto como mediadores de

la porfiria inducida en hígado por compuestos polihalogenados, es razonable entonces que esta inducción tenga lugar tanto en células hepáticas como renales.

IV.4.3 Aporte del riñón a las manifestaciones clínicas de las porfirias humanas

El papel del riñón en la etiología de las manifestaciones clínicas de las porfirias humanas recibió hasta ahora poca atención. Algunas evidencias sugieren el origen renal de la coproporfirina urinaria (Day *et al.*, 1978; Day *et al.*, 1980). Estudios realizados con orina de pacientes con daño renal severo y sometidos a hemodiálisis, revelaron que la concentración urinaria de coproporfirina decrece conforme aumenta el deterioro de la función renal, sin observar acumulación del pigmento ni en plasma ni en el dializado (Day *et al.*, 1980). Los valores de coproporfirina urinaria se normalizaron en estos pacientes, luego de haber sido transplantados. Si la coproporfirina hubiera sido de origen extra renal, entonces la acumulación de la misma en plasma tendría que haber tenido lugar aún en ausencia de la función renal. Este hecho no ha sido observado (Day *et al.*, 1980).

Toda la información que se dispone para esclarecer qué papel desempeña el riñón en la etiología de las distintas porfirias provienen de estudios realizados con pacientes transplantados o bien en aquellos con falla renal que son dializados (Day *et al.*, 1980; Day & Eales, 1982). En un paciente con porfiria variegata, en la cual se encuentran normalmente niveles elevados de coproporfirina en plasma, no se encontró dicha acumulación luego de ser sometido durante 1 año a sesiones de diálisis (Day *et al.*, 1980). Esta es una evidencia más que sustenta el origen renal de la coproporfirina urinaria. En contraposición a este caso, otro paciente con porfiria variegata pero con función renal normal, presentó acumulación de uro- y coproporfirina durante los ataques agudos.

También se han hecho observaciones respecto a la importancia del riñón en la formación de porfirinas urinarias en la PCT (Day & Eales, 1980; Day *et al.*, 1981). En este caso los pacientes con PCT sometidos a diálisis acumularon muy poca cantidad de

uroporfirina en el plasma durante el período de tratamiento, aún cuando no tuvo lugar ni excreción significativa, ni pasaje a la bilis o al líquido de diálisis. Basándose en esta observación estos autores afirman que si el exceso de porfirinas que normalmente se excretan por la orina en individuos con PCT fuera de origen hepático, entonces tendría que tener lugar una significativa acumulación de las mismas en la bilis y el dializado.

IV.5. Bibliografia

Blekkenhorst G., Day R. & Eales L (1980) The effect of bleeding and iron administration on the development of hexachlorobenzene induced rat porphyria. *Int. J. Biochem.* **12**: 1013-1017.

Day R. & Eales L. (1980) Porphyrins in chronic renal failure. *Nephron* **26**: 90-95.

Day R. & Eales L. (1982) Porphyrin in renal transplantation. *Nephron* **30**: 22-27.

Day R., Blekkenhorst G. & Eales L. (1980) Hepatic porphyrins in variegate porphyria. *N. Engl. J. Med.* **363**: 1368-1369.

Day R., Eales L. & Disler P. (1981) Porphyrins and the kidney. *Nephron* **28**: 261-267.

Day R., Salamanca R E de & Eales L. (1978) Quantitation of red cell porphyrins by fluorescence scanning after thin layer chromatography. *Clinica Clin. Acta* **89**: 25-33.

Fowler B. & Woods J. (1977) Ultrastructural and biochemical changes in renal mitochondria following chronic oral methyl mercury exposure: The relationship to renal function. *Exp. Molec. Pathol.* **27**: 403-412.

Fowler B., Hook G. & Lucier G. (1977) Tetrachlorodibenzo-p-dioxin induction of renal microsomal enzyme systems: ultrastructural effects on the parts recta(S3) proximal tubule cells of the rat kidney. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **203**: 712-721.

Fowler B., Oskarsson A. & Woods J. (1987) Metal and metalloid induced porphyrinurias: relationship to cell injury. *Ann. New York Acad. Sci.* **514**: 172-182.

Ivanov E. Todorov D., & Adjarov D. (1976) Porphyrin metabolism in renal diseases. III. Mechanisms of renal excretion of porphyrins. *Nephron* **17**: 396-401.

Kreimer-Birnbaum M. & Grinstein M. (1965) Porphyrin biosynthesis III. Porphyrin metabolism in experimental lead poisoning. *Biochim. Biophys. Acta* **111**: 110-123.

Maines M. (1977) Metals as regulators of heme metabolism. *Science* **198**: 1215-1219.

Maines M. (1983) New developments in the regulation of heme metabolism and their implications. *CRC Crit Rev. Toxicol.* **12**: 241-314.

Martasek P., Jirsa M., & Kordac V. (1982) Role of the kidneys in porphyrias. *Nephron* **32**: 227-278.

Miranda C., Henderson M. & Wang J. (1986) Induction of acute renal porphyria in japanese quail by Arochlor 1254. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 3637-3639.

Woods J (1979) Urinary porphyrins in the epidemiologic evaluation of chronic mercury toxicity. *Soc. Epid. Res.* **12**: 12-18.

Woods J. (1981) Elevated urinary porphyrins as a predictive biological indicator of individual sensitivity to occupational mercury toxicity. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **90**: abstract.

Woods J. (1988) Regulation of porphyrin and heme metabolism in the kidney. *Seminars in Hematology* **25** :336-348.

Woods J. & Fowler B. (1977) Renal porphyrinuria during chronic methyl mercury exposure. *J. Lab. Clin. Med.* **90**: 266-273.

Woods J. & Fowler B. (1987) Metal alteration of uroporphyrinogen decarboxylase and coproporphyrinogen oxidase. *Ann. NY Acad. Sci.* **514**: 54-64.

Woods J., Eaton D. & Lukens C. (1984) Studies on porphyrin metabolism in the kidney. Effect of trace metals and glutathione on renal uroporphyrinogen decarboxylase. *Molec. Pharmacol.* **26**: 336-341.

MATERIALES
y
METODOS

CAPITULO I

Materiales

	Página
I.1. Animales.....	80
I.2. Reactivos.....	80
I.3. Geles y columnas.....	81
I.4. Equipos.....	81
I.5. Bibliografía.....	83

I. MATERIALES

I.1. Animales

Se emplearon ratas macho CHbb THOM de 200 - 300 g de peso, alimentadas con dieta normal para animales de laboratorio (Purina 3) y agua *ad libitum* y mantenidas en un ciclo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad.

Los animales se sacrificaron entre las 11:00 y las 12:00 horas bajo anestesia con éter. Los hígados se perfundieron desde la vena porta, y los riñones desde la arteria renal, con solución fisiológica fría. Ambos órganos se extrajeron inmediatamente, se lavaron con la misma solución y se guardaron a -20°C hasta el momento de ser utilizados en los experimentos.

I.2. Reactivos

El ácido δ -aminolevúlico (ALA), el ácido fólico, la sulfamerazina (SMZ), las proteínas empleadas como marcadores de masa molecular y los anticuerpos y colorantes utilizados en los Western blots, se adquirieron en Sigma Chemical Co., St. Louis - Mo (USA).

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

Los patrones de porfirinas empleados en el HPLC procedían de Porphyrin Products, Salt Lake City - Utah (EE.UU) y los solventes utilizados durante las corridas fueron de grado HPLC de Merck, Darmstadt (Alemania).

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

I.3. Geles y columnas

Los geles de Sephadex G-25 (grueso), Sephadex G-100, Q-Sepharosa Fast Flow y Blue Sepharosa CL-4B se adquirieron en Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (Suecia). Las columnas LiChroCart 125-4 y LiChroSorb RP-18 para las corridas de HPLC fueron obtenidas de Merck, Darmstadt (Alemania).

Las dimensiones de las columnas fueron las siguientes:

- Sephadex G-25 grueso: volumen de cama: 50 ml; diámetro: 2,0 cm; longitud: 16 cm.
- Sephadex G-100: volumen de cama: 200 ml; diámetro: 2,5 cm; longitud: 50 cm.
- Q-Sepharosa: volumen de cama: 80 ml; diámetro: 2,0 cm; longitud: 25,5 cm.
- Blue-Sepharosa: volumen de cama: 12 ml; diámetro: 1,0 cm, longitud: 16 cm.

I.4. Equipos

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

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

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en equipos Shimadzu modelo UV-210 o Hewlett Packard modelo HP 8452 A.

Las mediciones de pH se realizaron con un pHmetro Beckman modelo Φ 12 pH.

Durante la purificación de las enzimas por medio de las distintas columnas cromatográficas, se utilizó un colector de fracciones modelo LKB Super Frac de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (Suecia). Las soluciones proteicas se concentraron empleando Centriprep 10 de Amicon (USA).

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

Las corridas electroforéticas se realizaron empleando el equipo Mini Protean de Bio-Rad (USA).

I.5. Bibliografia

Sancovich H., Ferramola A., Batlle A. & Grinstein M. (1970) Preparation of porphobilinogen. In *Methods in Enzymology* (Tabor H. & Tabor C. W.; eds.); Academic Press, New York; **Vol XVII**: 220-222.

CAPITULO II

Métodos

	Página
II.1. Preparación de los extractos enzimáticos.....	84
II.1.1 Obtención de la PBG-D de hígado	84
II.1.2 Obtención de la PBG-D de riñón	85
II.2. Columnas	85
II.2.1 Tamiz molecular Sephadex G-100	85
II.2.2 Intercambio iónico Q-Sepharosa	86
II.2.3 Columna de afinidad Blue Sepharosa	86
II.3. Sistema de incubación de la enzima PBG-Deaminasa.....	86

	Página
II.4. Determinaciones.....	87
II.4.1 Porfirinas por espectrofotometría.....	87
II.4.2 Porfirinas por HPLC	87
II.4.3 Tipo isomérico de porfirinas por HPLC	89
II.4.4 Contenido proteico	91
II.4.4.1 Método de Lowry	91
II.4.4.2 Método de Bradford	92
II.4.4.3 Método de Warburg y Christian	93
II.5 Electroforesis	94
II.5.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida	94

	Página
II.5.2 Determinación de la actividad en el gel	94
II.5.3 Electrotransferencia y Western blots	94
II.6 Masa molecular relativa (Mr).....	96
II.6.1 Determinación de la Mr mediante cromatografía de filtración por geles.	96
II.6.2 Determinación de la Mr en geles de poliacrilamida	97
II.7. Tratamiento de datos.....	97
II.7.1 Unidad enzimática	97
II.7.2 Velocidades iniciales	97
II.7.3 Análisis de datos	97
II.8. Bibliografía	98

II. METODOS

II.1. Preparación de los extractos enzimáticos

II.1.1 Obtención de la PBG-D de hígado

Todos los procedimientos se realizaron a 4°C. El hígado se cortó en pequeños trozos que se secaron sobre papel de filtro. El homogenato 10% (p/v) se preparó en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,2. A partir del mismo se aplicaron las siguientes etapas:

- 1) **Centrifugación:** El homogenato **H** se centrifugó durante 20 minutos a 24000 x g y se descartó el precipitado.
- 2) **Ultracentrifugación:** El sobrenadante **S** proveniente del paso anterior se ultracentrifugó a 105000 x g durante 1 hora con el propósito de clarificar la solución.
- 3) **Calentamiento:** Al sobrenadante **S_u** proveniente del paso anterior se lo calentó a 65°C durante 10 minutos y se eliminó por centrifugación la proteína desnaturalizada.
- 4) **Fraccionamiento salino F_s:** El sobrenadante **S_u** de la etapa anterior, se trató con sulfato de amonio sólido hasta un 35% de saturación. Se descartó el precipitado carente de actividad enzimática y el sobrenadante se llevó hasta 70%. Luego de 40 minutos de agitación, se centrifugó durante 20 minutos a 24000 x g. El precipitado obtenido se disolvió en el menor volumen posible de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,2 y se cromatografió en una columna de Sephadex G-25 con el objeto de eliminar los iones amonio.

A menos que se indique lo contrario, se utilizará la fracción **F_s**, purificada aproximadamente 20 veces respecto al homogenato, como extracto enzimático.

II.1.2 Obtención de la PBG-D de riñón

Los riñones se descapsularon, se lavaron con solución fisiológica y se secaron sobre papel de filtro. Posteriormente se cortaron en pequeños trozos. En los casos en que se utilizó la corteza y la médula, se debió seccionar el órgano longitudinalmente y con una lupa se visualizaron los límites de ambos tejidos. El tejido se pesó y se homogenizó en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,2 en una relación 10% (p/v). Se aplicó posteriormente la siguiente secuencia de pasos:

- 1) **Centrifugación:** El homogenato **H** se centrifugó durante 20 minutos y se descartó el precipitado.
- 2) **Calentamiento:** El sobrenadante **S** del paso anterior se calentó a 70°C durante 5 minutos y se eliminó por centrifugación la proteína desnaturalizada.
- 3) **Fraccionamiento salino F_s:** Se procedió de igual forma que en el caso de la enzima hepática (ítem M-II.1.1).

A menos que se indique lo contrario, se utilizará esta fracción como extracto enzimático en los estudios cinéticos.

II.2. Columnas

II.2.1 Tamiz molecular Sephadex G-100

Se empleó buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2 para equilibrar las columnas y eluir las proteínas. Se recogieron fracciones de 2,5 ml con un flujo constante de 9 ml/h.

II.2.2 Intercambio iónico Q-Sepharosa

La columna se equilibró con buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2. La proteína se eluyó con 200 ml de buffer y 200 ml de un gradiente lineal de NaCl (0 - 1,0 M) en el mismo buffer. El flujo se mantuvo constante durante toda la corrida a 45 ml/h. Se recogieron fracciones de 3,0 ml.

II.2.3 Columna de afinidad de Blue Sepharosa

La columna se equilibró con buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,2 y la elución de la PBG-D de hígado se realizó con 30 ml del mismo buffer, 30 ml de un gradiente lineal de NaCl (0,2 - 1,0 M) y 10 ml de NaCl 1,0 M en el mismo buffer de equilibrio.

Para el caso del riñón, la elución de la PBG-D se realizó con 30 ml de un gradiente lineal de NaCl (0,3 - 1,1 M) y 10 ml de NaCl 1,1 M en el mismo buffer de equilibrio. Se recogieron fracciones de 1,5 ml a un flujo constante de 18 ml/h. Luego se lavó la columna con 40 ml de urea 6,0 M y NaCl 0,5 M en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,2 y con 50 ml del buffer de equilibrio.

II.3. Sistema de incubación de la enzima PBG-Deaminasa

El sistema standard de incubación contenía 0,5 ml de fracción enzimática, PBG (30 µg/1 ml) y buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2 hasta completar un volumen final de 1 ml. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C, en aerobiosis durante 1 h, en oscuridad y con agitación continua. En todos los casos se efectuaron los blancos de actividad enzimática correspondientes, los cuales contenían PBG o fracción enzimática y buffer.

Finalizada la incubación, la reacción se detuvo precipitando la proteína por agregado de un volumen adecuado de HCl (c) hasta alcanzar una concentración final de

5%. Posteriormente se separó el precipitado por centrifugación y los sobrenadantes se iluminaron con luz natural durante 20 min.

Para medir las velocidades iniciales de la reacción catalizada por la PBG-D, se midieron las porfirinas formadas a distintos tiempos (0 - 20 minutos), empleando concentraciones de PBG que oscilaron entre 1 y 66 μM . De las pendientes de las curvas se obtuvieron los valores de las distantes velocidades iniciales.

II.4. Determinaciones

II.4.1 Porphirinas por espectrofotometría

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

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

A : absorbancia a las longitudes de onda indicadas en los subíndices;

V_f : volumen final;

f : 1,008 (factor correspondiente a uroporfirina)

II.4.2 Porphirinas por HPLC

La separación y determinación cromatográfica de las porfirinas libres se realizó según la técnica de Seubert & Seubert (1989). Las condiciones empleadas fueron las siguientes:

Columna: RP-18, longitud: 125 mm

diámetro interno: 4 mm

diámetro de partículas: 7 μm .

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

Solvente B: metanol

Flujo: 1,5 ml/min

Volumen de muestra: 20 μl

Temperatura de corrida: 30°C

Las porfirinas eluyeron mediante un gradiente lineal de metanol (62 - 100%) en 5 min y manteniendo el 100% de metanol por otros 5 min más. La detección de las porfirinas eluidas se realizó espectrofluorométricamente empleando longitudes de onda de excitación y emisión de 405 nm y 630 nm respectivamente.

Las muestras se filtraron previamente empleando filtros Whatman de 0,2 μm de poro. La separación de porfirinas patrones, de concentración conocida, muestra el siguiente cromatograma (Figura M-II.1). Los tiempos de retención correspondientes se resumen en la Tabla M-II.1.

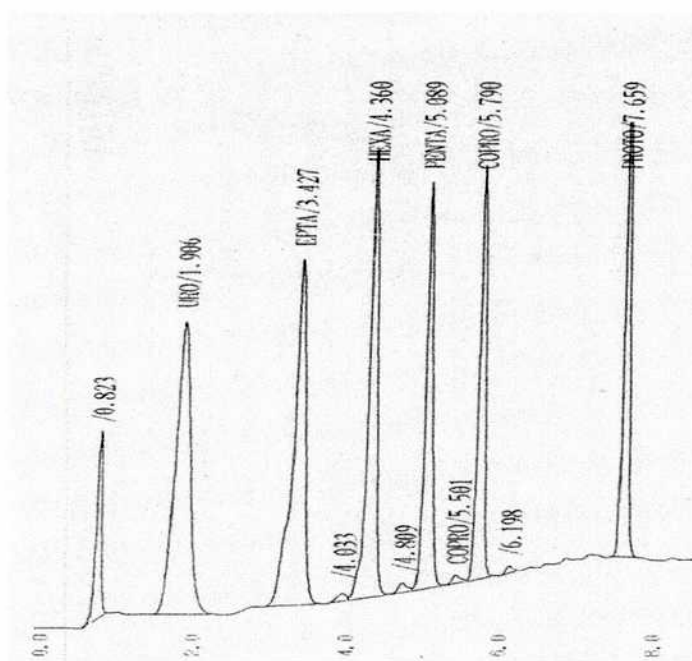


FIGURA M-II.1: Cromatograma de las porfirinas separadas por HPLC.

TABLA M-II.1: Tiempos de retención para la separación de porfirinas por HPLC

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

II.4.3 Tipo isomérico de porfirinas por HPLC

La determinación del tipo isomérico de las porfirinas formadas se realizó según la técnica de Lim *et al.*, (1983). Las condiciones empleadas fueron las siguientes:

Columna: RP-18, longitud: 125 mm

diámetro interno: 4 mm

diámetro de partículas: 7 μ m

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

Solvente B: acetonitrilo

Flujo: 1,0 ml/min

Volumen de muestra: 20 μ l

Temperatura de corrida: 30°C

Las porfirinas se eluyeron empleando un gradiente lineal de acetonitrilo (10 - 30%) en 15 minutos y manteniendo el 30% de acetonitrilo por otros 10 min más. La detección de las porfirinas eluidas se realizó por espectrofotometría a 404 nm. Las muestras se filtraron previamente a la inyección empleando filtros Whatman de 0,2 μm de poro.

La separación de porfirinas patrón, de concentración conocida, muestra el siguiente cromatograma (Figura M-II.2). Los tiempos de retención de los distintos isómeros I y III se detallan en la Tabla M-II.2.

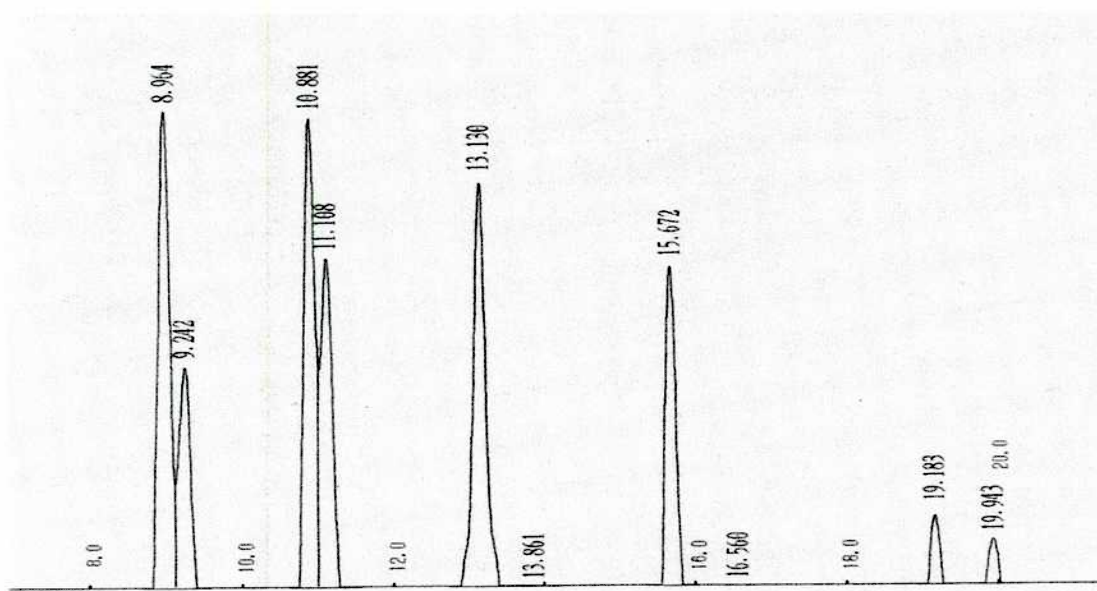


FIGURA M-II.2: Cromatograma de las porfirinas separadas por HPLC según el tipo isomérico.

TABLA M-II.2: Tiempos de retención de los isómeros I y III de porfirinas patrón

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

II.4.4. Contenido proteico

II.4.4.1 Método de Lowry

El contenido proteico de las preparaciones enzimáticas se determinó empleando el reactivo de Folin-Ciocalteu (Lowry *et al.*, 1951). A 0,4 ml de la dilución apropiada de la proteína, en agua o en NaOH 0,6 M para proteínas solubles o insolubles respectivamente, se les agregó 2,5 ml de una mezcla alcalina compuesta de Na₂CO₃ 2%, CuSO₄ y tartrato de sodio y potasio en relación 100:1:1 (v:v:v). Se mezcló y se dejó reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se le añadieron 0,2 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido adecuadamente con agua (1:2); se agitó rápidamente y se midió la absorbancia a 660 nm a los 30 minutos. Se utilizó seroalbúmina bovina como standard.

Paralelamente se realizó el blanco de reactivos que contenía la mezcla alcalina, el reactivo de Folin-Ciocalteu y agua y la cantidad de proteína se calculó aplicando la siguiente expresión:

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

A_{660} : absorbancia de la muestra a 660 nm

A_{bco} : absorbancia del blanco de reactivos a 660 nm

f : factor obtenido de la curva de calibración

F_{dil} : factor de dilución

II.4.4.2 Método de Bradford

El Tris a la concentración utilizada (50 mM) interfiere en el método de Lowry *et al.*, (1951). Por este motivo, durante la purificación de la PBG-D se utilizó el método de Bradford (1976).

A 0,1 ml de una dilución apropiada de la proteína en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2 se le agregaron 2,5 ml de una solución compuesta por 0,01% (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (p/v) de etanol (95%) y 8,5% (p/v) de ácido fosfórico (85%). Luego de 10 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm contra un blanco preparado con 0,1 ml del buffer correspondiente y 2,5 ml de reactivo. La cantidad de proteína se calculó aplicando la siguiente expresión:

$$\text{proteína (mg/ml)} = A_{595} \cdot f \cdot F_{\text{dil}}$$

A_{595} : absorbancia de la muestra a 595 nm

f : factor obtenido de la curva de calibración

F_{dil} : factor de dilución

II.4.4.3 Método de Warburg y Christian

Las proteínas presentes en los eluidos de las diferentes columnas se cuantificaron directamente empleando el método de Warburg y Christian (1941). El contenido proteico se calculó usando la siguiente expresión:

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

A_{260} : absorbancia de la muestra a 260 nm

A_{280} : absorbancia de la muestra a 280 nm

F_{dil} : factor de dilución

II.4.5 Cuantificación de PBG

El PBG se cuantificó empleando el reactivo de Ehrlich, según la metodología de Mauzerall y Granick (1956). Este reactivo, sumamente estable en frío y oscuridad, consiste en una mezcla de 2 g de p-dimetilaminobenzaldehído en HCl (c) (25 ml) y ácido acético glacial (75 ml).

La técnica empleada consiste en mezclar un volumen de la muestra diluída apropiadamente con igual volumen del reactivo a temperatura ambiente. El producto de esta reacción es un compuesto rojo, cuyo color alcanza su máxima intensidad a los 8 minutos manteniéndose constante hasta los 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, la intensidad comienza a decrecer ya que tiene lugar una reacción del complejo con una segunda molécula de pirrol. La concentración de PBG se calcula empleando la siguiente expresión:

$$\text{PBG } (\mu\text{g/ml}) = (A_{555} \cdot 1000 \cdot F_{dil}) / \epsilon$$

A_{555} : Absorbancia a 555 nm

F_{dil} : Factor de dilución

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

II.5. Electroforesis

II.5.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Laemmli, 1970) con los extractos provenientes de las distintas etapas de purificación. Se utilizaron geles concentradores (4%) y separadores (7,5 y 10%). Los geles se corrieron a temperatura ambiente aplicando una diferencia de potencial de 170 V durante 60 minutos. Las bandas proteicas se revelaron por tinción de los geles con Coomassie Brilliant Blue R-250.

II.5.2 Determinación de la actividad en el gel

La proteína se sembró en un gel nativo de poliacrilamida (7,5%). Luego de la corrida electroforética, realizada a 4° C, una de las calles se tiñó con Coomassie Brilliant Blue y las otras se cortaron en tiras de 3 mm de alto. Estas se incubaron con PBG, empleando el sistema standard de incubación (ítem M-II.3) pero a 60°C durante 90 minutos. Se calculó el Rf de la porción de gel que presentó actividad y se relacionó con la movilidad de las bandas proteicas reveladas con el colorante.

II.5.3 Electrotransferencia y Western blots

La proteína separada por electroforesis en geles de poliacrilamida se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, BA 85 de 0,45 μ m) empleando un equipo Mini Transblot de Bio-Rad (Richmond, CA; USA). La electrotransferencia se llevó a cabo siguiendo la metodología descripta por Towbin *et al.*, (1979), a 4°C durante 1h a 100 V, usando como buffer de transferencia Tris 20 mM, glicina 192 mM pH 8,3, metanol 20% (v/v). El gel a transferir y la membrana de nitrocelulosa se saturaron en dicho buffer durante 30 min. antes de armar el equipo.

Una vez completada la transferencia, la proteína se reveló a través de las siguientes etapas:

- 1) se incubó la membrana durante 1h con agitación lenta, en buffer TBS compuesto de seroalbúmina bovina (SAB) 5% y SDS 0,1% en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,0 conteniendo NaCl 150mM, para bloquear los sitios libres de proteínas;
- 2) se trató la membrana con suero de conejo anti-PBG-D de *Euglena gracilis* (dil 1: 1000) en TBS preparado conteniendo SAB 2%, durante 1 h con agitación lenta;
- 3) se lavó la membrana 5 veces durante 10 min. cada vez, con buffer TBS y agitación rápida;
- 4) se trató la membrana con suero de cabra antisuero de conejo (dil 1: 1000) durante 1 h con agitación lenta;
- 5) se repitieron los 5 lavados con buffer TBS en las condiciones descriptas en la etapa 3;
- 6) se trató la membrana con suero de conejo antisuero de cabra marcado con la enzima fosfatasa alcalina, durante 1 h con agitación lenta;
- 7) se realizaron 7 lavados con buffer TBS en las condiciones descriptas en la etapa 3;
- 8) se reveló la banda proteica agregando 50 ml de una solución que contenía 200 μ l de nitro-blue tetrazolium NTB (75 mg/ml en dimetilformamida 70%) y 150 μ l de 5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato BCIP (50 mg/ml en dimetilformamida 100%) en buffer Tris-HCl 100 mM pH 9,0 conteniendo NaCl 100 mM y $MgCl_2$ 5 mM, preparado en el momento de uso. Se agitó lentamente hasta la aparición de color.

II.6. Masa molecular relativa (M_r)

II.6.1 Determinación de la M_r mediante cromatografía de filtración por geles

El armado de las columnas de Sephadex G-100 así como el tratamiento previo del gel se realizó según la técnica descripta por Batlle (1968).

La curva de calibración se obtuvo empleando proteínas patrón y graficando $\log$ de M_r en función de K_{av} ($r: 0,973$) (Figura M-II.3).

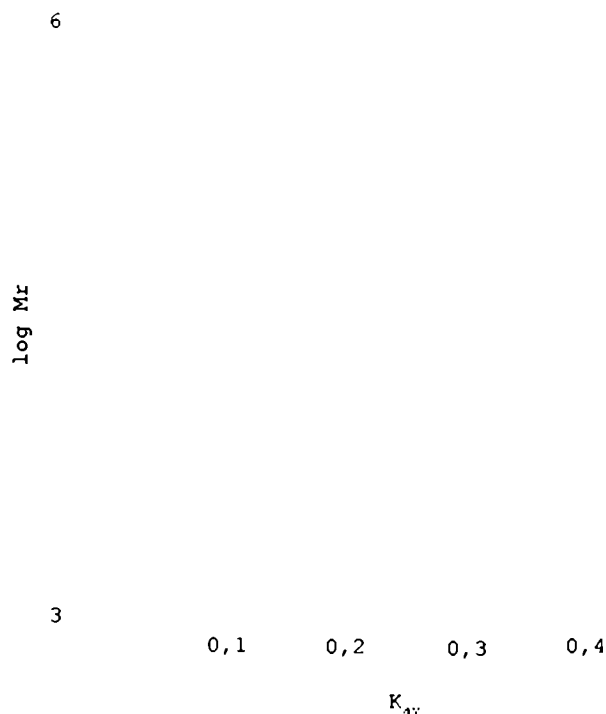


FIGURA M-II.3: Curva de calibración de la columna de Sephadex G-100 con proteínas patrón: γ -globulina (160 kDa), albúmina bovina (65 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), ribonucleasa (25 kDa) y citocromo C (12,5 kDa).

II.6.2 Determinación de la Mr mediante el empleo de geles de poliacrilamida

La masa molecular relativa se calculó empleando un gel desnaturalizante con SDS. Se sembraron las muestras y una solución de proteínas standards conocidas y se utilizaron las condiciones de corrida descritas anteriormente (ítem M-II.5.1).

II.7. Tratamiento de datos

II.7.1 Unidad enzimática

Se define una unidad enzimática (UE) como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de uroporfirina I en las condiciones standard de incubación.

La actividad específica (Ae) se define como la actividad medida en condiciones standard de incubación, expresada en nmoles por mg de proteína.

II.7.2 Velocidades iniciales

Las velocidades iniciales se expresan en picomoles de porfirinas formadas en un minuto por mg de proteína (pmoles/minmg).

II.7.3 Análisis de datos

Los datos presentados corresponden a promedios $\pm$ S.D. calculados a partir de 4 experimentos independientes realizados cada uno por duplicado.

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

II.8. Bibliografía

Batlle A. (1968) Cromatografía con tamices moleculares. *Ciencia e Investigación* **24**: 242-261.

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lim C.K., Rideout J.M. & Wright D.J. (1983) Separation of porphyrins isomers by high performance liquid chromatography. *Biochem. J.* **211**: 435-438.

Lowry O.H., Rosebrough N.J. Farr A.L. & Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Mauzerall D. & Granick S. (1956) The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* **219**: 435-446.

Rimington C. (1960) Spectral absorption coefficients of some porphyrins in the Soret band region. *Biochem. J.* **75**: 620-623.

Seubert S. & Seubert A. (1989) Porphyrin Bestimmung in Harn. *Merck Spectrum* **2**: 8-9.

Towbin H., Staehelin T. & Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.

Warburg O. & Christian W. (1941) Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermente Enolase. *Biochem. Z.* **310**: 384-421.

RESULTADOS
y
DISCUSION

CAPITULO I

Optimización del sistema de incubación de la PBG-Deaminasa de hígado y riñón de rata

	Página
I.1. Introducción.....	99
I.2. Condiciones de extracción de la PBG-D de hígado y riñón de rata.....	99
I.2.1 Selección del método de extracción.....	99
I.2.2 Selección del medio de extracción.....	100
I.3. Optimización del sistema de incubación.....	103
I.3.1 Efecto de la concentración de proteína.....	103
I.3.2 Efecto del tiempo de incubación.....	103
I.3.3 Efecto de la concentración de sustrato.....	106
I.3.4 Efecto de la temperatura de incubación.....	108
I.3.5 Determinación del pH óptimo de incubación.....	110
I.4. Efecto del estacionamiento sobre la actividad de la enzima.....	112

I. OPTIMIZACION DEL SISTEMA DE INCUBACION DE LA PBG-D DE HIGADO Y RIÑON DE RATA

I.1. Introducción

Inicialmente se realizaron una serie de experiencias para establecer las condiciones óptimas de extracción, detección y medición de la actividad enzimática.

Los datos que se presentan corresponden a promedios de repetidos ensayos realizados por duplicado.

I.2. Condiciones de extracción de la PBG-D de hígado y riñón de rata

I.2.1 Selección del método de extracción

Los hígados se cortaron en pequeños trozos y se lavaron con solución fisiológica fría, se secaron sobre papel de filtro y se pesaron antes de homogeneizarlos en una solución de sacarosa 0,25 M, en una relación 10% (p/v). Para esta operación se utilizaron dos métodos de homogeneización: el Potter-Elvehjem (con tubo de vidrio y émbolo de teflón) y el Ultra-turrax. El homogenato (H) así obtenido se centrifugó a 24000xg durante 20 min. para separar núcleos, células intactas y mitocondrias. El sobrenadante (S) se incubó en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4 según se detalla en Materiales y Métodos (ítem M-II.3). Se procedió de forma idéntica con los riñones. La Tabla R-I.1 muestra que ambas técnicas de homogeneización son igualmente efectivas. De ahora en más se empleará como método de ruptura el potter Elvehjem con émbolo de teflón.

Tabla R-I.1: Efecto del método de homogeneización

Fuente enzimática	Método de homogeneización	Proteínas (mg/ml)	Porfirinas formadas	
			Actividad (nmoles/ml)	Ae (nmoles/mg)
Hígado	potter	8,0	0,46	0,06
	ultra-turrax	7,0	0,43	0,06
Riñón	potter	6,9	0,63	0,09
	ultra-turrax	6,7	0,51	0,08

La actividad enzimática se midió en la fracción S de acuerdo con lo detallado en Métodos. Los errores en las determinaciones no exceden el 5 - 8%.

I.2.2 Selección del medio de extracción

Se decidió seleccionar el medio más conveniente para la extracción de la PBG-D de hígado y de riñón de rata. Con este fin se utilizaron para la preparación del homogenato soluciones de sacarosa 0,25 M, buffer fosfato de sodio (BFS) 50 mM y buffer Tris-HCl 50 mM a distintos pH's.

En la Tabla R-I.2 se muestran los resultados obtenidos empleando la fracción S como fuente enzimática para la enzima proveniente de hígado.

De acuerdo con los valores de actividad específica obtenidos, se seleccionó para la extracción de la enzima hepática el buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2. El homogenato se preparó en una relación del 10% (p/v).

Tabla R-I.2: Efecto de la sacarosa y de distintos buffers en la extracción de la PBG-D de hígado de rata

Fuente enzimática	Medio de extracción	p/v (%)	Proteína (mg/ml)	Porfirinas formadas	
				Actividad (nmoles/ml)	Ae (nmoles/mg)
Hígado	Sacarosa 0,25 M	10	8,0	0,46	0,06
	Sacarosa 0,25 M	35	4,5	0,18	0,04
	BFS pH 7,4	10	7,4	0,08	0,01
	BFS pH 8,2	10	7,8	0,09	0,01
	BFS pH 7,4	35	3,1	0,03	0,01
	BFS pH 8,2	35	3,1	0,03	0,01
	Tris-HCl pH 7,4	10	7,7	0,61	0,08
	Tris-HCl pH 8,2	10	8,0	0,64	0,08
	Tris-HCl pH 7,4	35	5,7	0,11	0,02
	Tris-HCl pH 8,2	35	3,5	0,12	0,03

Las condiciones de incubación se encuentran detalladas en Métodos. La actividad enzimática se midió en la fracción S obtenida según se describe en dicha sección. Los errores en las determinaciones no exceden el 5 - 8%.

Se ensayó el efecto de estos mismos medios de extracción sobre la actividad de la PBG-D renal. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla R-I.3.

Tabla R-I.3: Efecto de la sacarosa y de distintos buffers en la extracción de la PBG-D de riñón de rata

Fuente enzimática	Medio de extracción	p/v (%)	Proteína (mg/ml)	Porfirinas formadas	
				Actividad (nmoles/ml)	Ae (nmoles/mg)
Riñón	Sacarosa 0,25 M	10	6,9	0,63	0,09
	Sacarosa 0,25 M	35	5,1	0,35	0,07
	BFS pH 7,4	10	7,3	0,18	0,02
	BFS pH 8,2	10	7,2	0,21	0,03
	BFS pH 7,4	35	4,7	0,09	0,02
	BFS pH 8,2	35	4,7	0,08	0,02
	Tris-HCl pH 7,4	10	7,1	0,67	0,09
	Tris-HCl pH 8,2	10	7,3	0,70	0,10
	Tris-HCl pH 7,4	35	4,6	0,28	0,06
	Tris-HCl pH 8,2	35	5,3	0,36	0,07

Las condiciones de incubación se encuentran detalladas en Métodos. La actividad enzimática se midió en la fracción S obtenida según se describe en la misma sección. Los errores en las determinaciones no exceden el 5 - 8%.

Si bien la actividad específica que se obtiene al homogeneizar con sacarosa es igual a la obtenida con el buffer Tris-HCl, se optó por esta última solución pues amortigua mejor los cambios de pH. A menos que se indique lo contrario, el homogenato se prepara en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2 en una relación del 10% (p/v).

I.3. Optimización del sistema de incubación

I.3.1 Efecto de la concentración de proteína

Todas las experiencias realizadas para obtener el sistema óptimo de incubación se llevaron a cabo empleando la fracción enzimática F_s , obtenida según se detalla en Métodos (ítem M-II.1.1). En el rango de concentraciones de proteína utilizado (0,12 - 1,50 mg/ml) se observa tanto para la PBG-D de hígado como para la enzima de riñón, una relación lineal entre la cantidad de producto formado en 2 horas de incubación y la concentración proteica (Figura R-I.1).

Este comportamiento coincide con el hallado para la PBG-D de otras fuentes (Araujo *et al.*, 1987; Kotler *et al.*, 1987a; Rossetti *et al.*, 1987).

I.3.2 Efecto del tiempo de incubación

Al estudiar el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la PBG-D de callos de soya (Llambías & Batlle, 1971), *Euglena gracilis* (Rossetti & Batlle, 1977; Rossetti *et al.*, 1977; Battersby *et al.*, 1982) y eritrocitos humanos (Smythe & Williams, 1988), se observó una fase lag en la síntesis de uroporfirinógenos. Estos resultados sugirieron la formación de intermediarios polipirrólicos durante la reacción de ciclotetramerización enzimática de PBG.

Con estos antecedentes se decidió, además de optimizar el tiempo de incubación, analizar si la PBG-D de hígado y de riñón de rata presentaba también este comportamiento. La Figura R-I.2 muestra una respuesta lineal para la enzima de ambas fuentes hasta los 150 min de incubación. Por lo tanto se adoptó 60 min como tiempo óptimo para la medición de la actividad enzimática. Resultados similares se encontraron para la PBG-D de hígado bovino (Sancovich *et al.*, 1969), *Saccharomyces cerevisiae* (Araujo *et al.*, 1987) y *Rp. palustris* (Kotler *et al.*, 1987a).

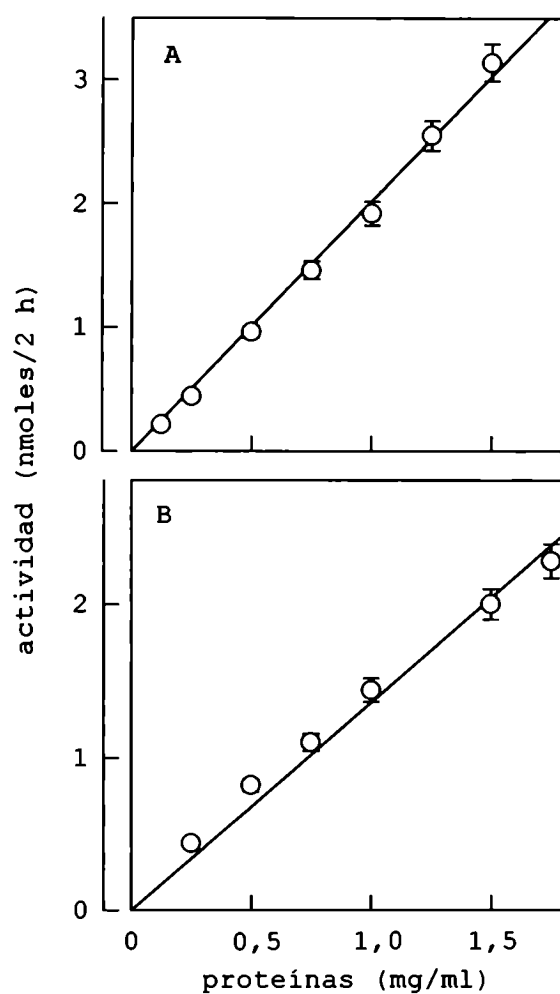


Figura R-I.1: Efecto de la concentración de proteína sobre la actividad de la PBG-D de hígado (A) (r : 0,998) y de riñón (B) (r : 0,992). La medición de actividad se realizó de acuerdo con lo descrito en Métodos, utilizando la fracción F_5 como extracto enzimático.

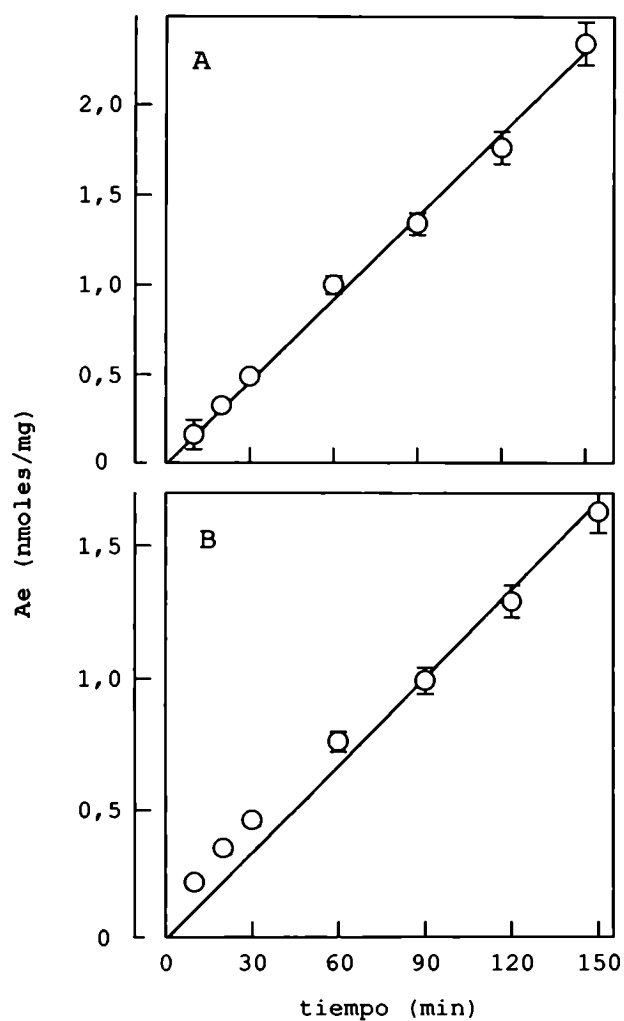


Figura R-I.2: Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad enzimática de la PBG-D de hígado (A) ($r: 0,999$) y riñón (B) ($r: 0,989$). Las condiciones de incubación son las descritas en Métodos.

I.3.3 Efecto de la concentración de sustrato

En las experiencias anteriores se utilizó una concentración final de PBG de 66 μM en la mezcla de reacción. Para optimizar esta variable se realizó la curva de saturación por sustrato.

Se determinaron las velocidades iniciales de reacción de la PBG-D con distintas concentraciones finales de PBG, que oscilaron entre 4 y 130 μM . La experiencia se efectuó de la forma indicada en Métodos, salvo que en cada caso se incubó una cantidad de PBG que representaba en el sistema de incubación una concentración final comprendida entre los valores antedichos. Se midió la formación de porfirinas a distintos tiempos y luego se extrapolaron las velocidades a tiempo cero.

Las curvas de saturación se muestran en la Figura R-I.3. A partir de una concentración de PBG de 66 μM se alcanza la saturación para la enzima hepática. Por lo tanto, se establece esta concentración como la óptima para medir su actividad.

En el caso de la enzima renal la respuesta de la velocidad ante la variación de sustrato es hipérbolica. La saturación se alcanza a una concentración de 70 μM , la cual se empleará como concentración óptima para medir la actividad de la enzima.

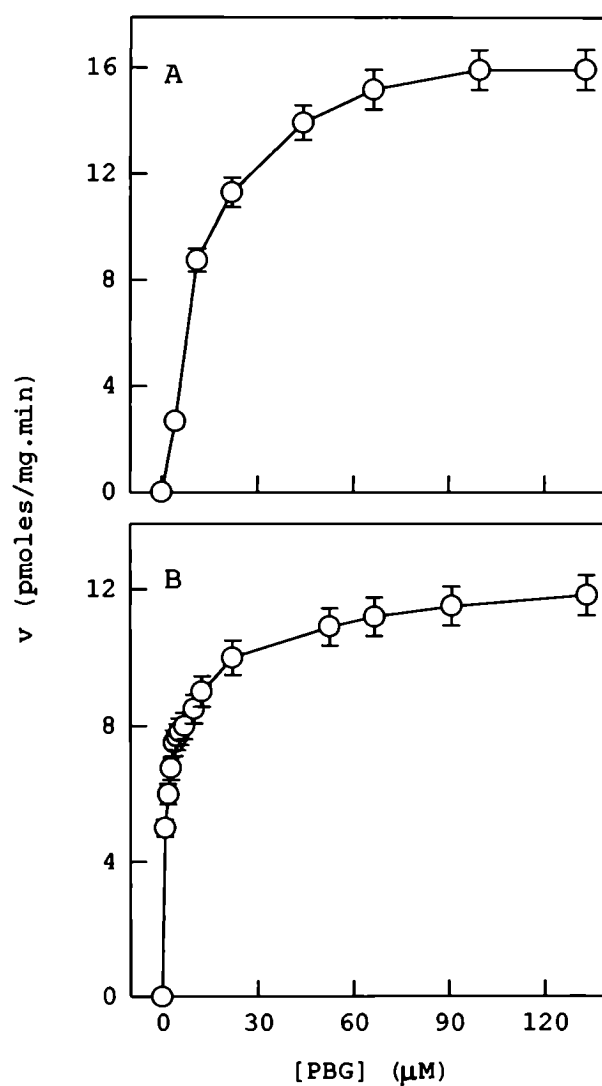


Figura R-I.3: Curva de saturación para la PBG-D de hígado (A) y riñón de rata (B). Las condiciones de medición de la actividad enzimática se encuentran detalladas en Métodos. v : velocidad inicial de la reacción.

I.3.4 Efecto de la temperatura de incubación

Cuando se estudió la formación de uroporfirinógeno I en función de la temperatura de incubación, se encontró para la PBG-D de ambos órganos un máximo bien definido a 65°C (Figura R-I.4). A esta temperatura la actividad específica de la PBG-D hepática es 5 veces mayor que el control incubado a 37°C, a 30°C disminuye un 76 % respecto al mismo control y a 0°C es nula. La actividad específica de la enzima renal a 65°C es 12 veces mayor que el control y a 30°C disminuye un 43%.

Dado que a temperaturas mayores que 37°C la formación de porfirinas aumenta notablemente a causa de la polimerización del PBG, los valores de actividad aquí informados se hallan corregidos.

Los estudios de estabilidad térmica se realizaron preincubando la enzima en ausencia de PBG durante 20 min a las temperaturas señaladas en la Figura R-I.4. Los resultados revelan que ambas enzimas son muy estables hasta los 75 °C.

Aplicando la ecuación de Arrhenius y graficando el log v en función de la inversa de la temperatura absoluta, se determinaron las energías de activación de la reacción enzimática en hígado, Ea: 16,8 kcal/mol y riñón de rata, Ea: 19,3 kcal/mol (Figura R-I.5).

Estos resultados son similares a los hallados para la enzima de *Euglena gracilis* (19,7 kcal/mol) (Williams *et al.*, 1981) y glándula de Harder (18,2 kcal/mol) (Cardalda *et al.*, 1997).

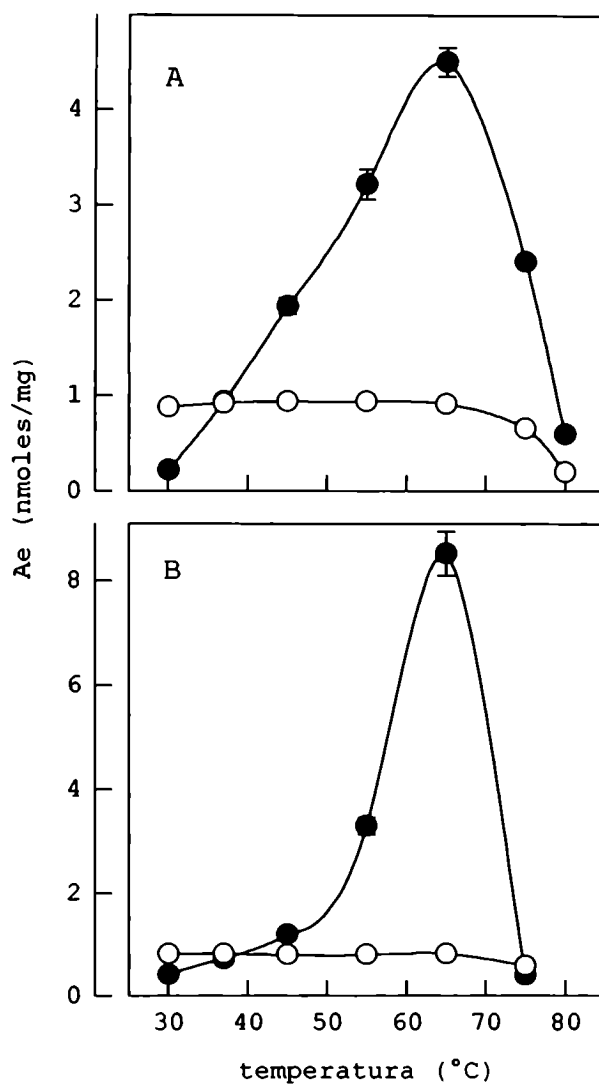


Figura R-I.4: Estabilidad térmica (O) y efecto de la temperatura de incubación (●) sobre la actividad de la PBG-D de hígado (A) y de riñón (B) de rata. La medición de actividad se efectuó de acuerdo con lo establecido en Métodos.

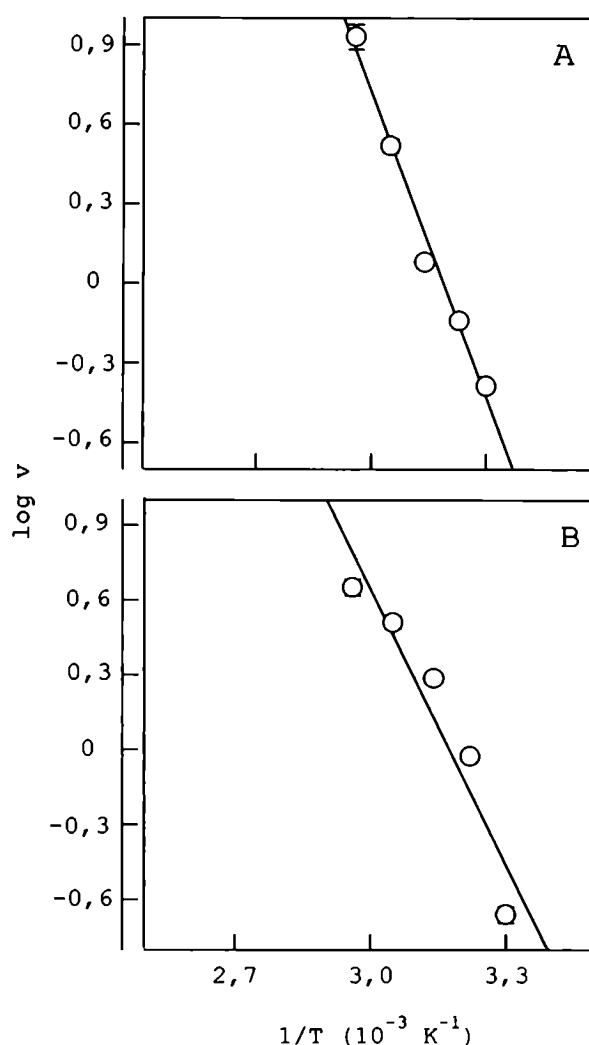


Figura R.I.5: Gráfico de Arrhenius para la reacción catalizada por la PBG-D de hígado (A) ($r: 0,970$) y riñón de rata (B) ($r: 0,813$). Se utilizaron los datos de la experiencia detallada en la Figura R-I.4.

I.3.5 Determinación del pH óptimo de incubación

En la Figura R-I.6 se representan las actividades específicas de la PBG-D de hígado y de riñón de rata en función del pH del buffer de incubación. En ambos casos se observa que la respuesta tiene forma de campana con máximos a pH's 7,8 y 8,2 para la enzima de hígado y riñón respectivamente.

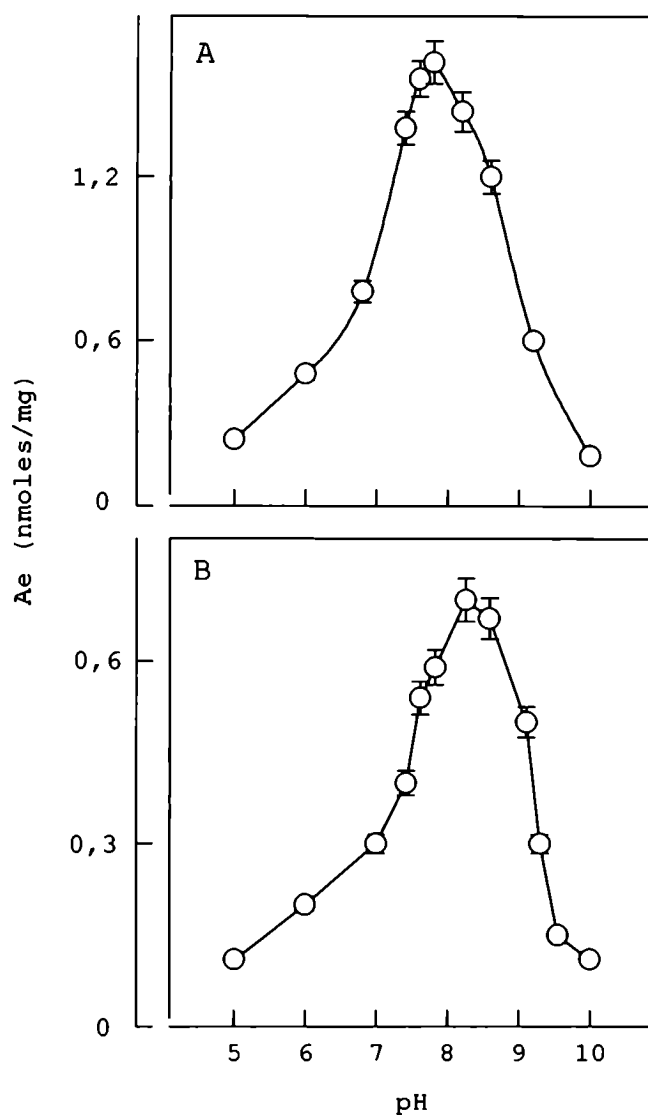


Figura R-I.6: Efecto del pH de incubación en la formación de porfirinas en hígado (A) y en riñón (B) de rata. La obtención de la fracción enzimática F_s y la medición de la actividad se detalla en Métodos.

Considerando que el agregado del extracto enzimático y la formación de productos de la reacción a lo largo del tiempo de incubación pueden afectar el pH del sistema, se graficó el promedio de los valores de pH medidos antes y después de la incubación.

I.4. Efecto del estacionamiento sobre la actividad de la enzima

Se almacenaron alícuotas (aproximadamente 5 ml) del extracto enzimático (1 mg/ml) a -20°C , con el propósito de medir su actividad en función del tiempo de estacionamiento. Los resultados (Tabla R-I.4) ponen de manifiesto un aumento de la actividad de la enzima hepática del 70% a los 30 días de almacenamiento a esa temperatura.

Tabla R-I.4: Efecto del estacionamiento sobre la actividad enzimática

Día	Porfirinas formadas (nmoles/mg)	
	Hígado	Riñón
0	0,88	0,75
2	0,96	0,75
3	0,90	0,75
6	1,12	0,74
10	1,09	0,76
17	1,28	0,74
28	1,28	0,73
37	1,47	0,70
91	1,52	0,60
124	1,50	0,50

Las condiciones de incubación se encuentran detalladas en Métodos. La actividad se midió en la fracción F_s . Los errores en las determinaciones no exceden el 5 - 8%.

Este fenómeno de activación espontánea por estacionamiento se observó también en fracciones de homogenato y sobrenadante de *Euglena gracilis* (Juknat *et al.*, 1981). Estudios posteriores demostraron que esa activación se debía a la presencia de 6-biopterina que modula la actividad de la PBG-D en ese organismo (Juknat *et al.*, 1988 a,b).

La PBG-D renal no muestra este fenómeno de activación y es muy estable en las condiciones ensayadas hasta los 36 días, recién luego de 4 meses pierde poco más del 30% de la actividad inicial.

CAPITULO II

Purificación y masa molecular de la PBG-Deaminasa de hígado y de riñón de rata

	Página
II.1. Ensayos preliminares.....	114
II.1.2 Tratamiento térmico.....	114
II.1.3 Precipitación isoelectrica.....	118
II.2. Purificación de la PBG-D hepática.....	118
II.3. Purificación de la PBG-D renal.....	123
II.4. Masa molecular relativa.....	127
II.4.1 Determinación de Mr por cromatografía de exclusión molecular.....	127

II. PURIFICACION Y MASA MOLECULAR DE LA PBG-D DE HIGADO Y RIÑÓN DE RATA

II.1. Ensayos preliminares

Se ensayaron distintos tratamientos a partir de la fracción sobrenadante S de 24000xg (ítem M-II.1) para establecer la secuencia de etapas óptimas para la purificación de ambas enzimas.

II.1.2 Tratamiento térmico

Debido a la naturaleza termoestable de la PBG-D, el calentamiento es uno de los procedimientos más utilizados para la purificación de esta enzima. Para ello se calentó la fracción S a diferentes temperaturas en un baño de agua durante 5 y 10 min con agitación constante. Transcurrido este tiempo se enfrió la preparación enzimática en un baño de hielo, se centrifugó a 24000xg durante 10 min y se descartó el precipitado. Se midió la actividad en el sobrenadante antes y después de calentar (S_0). Los datos se presentan en la Tabla R-II.1.

Las porfirinas sintetizadas durante estas incubaciones se analizaron por HPLC. Tanto la fracción S de hígado (Figura R-II.1A) como la de riñón (Figura R-II.1B) muestran en el cromatograma la formación predominante de uroporfirina III, uroporfirina I y heptaporfirina III. Sin embargo, es interesante destacar las diferencias que existen en ambos tejidos, al incubar la fracción S. Mientras el hígado presenta mayor porcentaje de tipo isomérico III: uroporfirina III (44%), heptaporfirina III (32%), hexaporfirina III (4%), coproporfirina III (7%) y sólo un 13% de uroporfirina I, el riñón muestra mayor cantidad de tipo I: 52% de uroporfirina I, uroporfirina III (38%) y heptaporfirina III

(10%), indicando distinta estabilidad de la enzima Isomerasa durante estas primeras etapas de purificación.

Tabla R-II.1: Efecto del calentamiento sobre la actividad enzimática

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Porfirinas formadas (nmoles/mg)	
		Hígado	Riñón
Control	-	0,08	0,10
55	5	0,47	0,46
	10	0,40	0,47
60	5	0,46	0,46
	10	0,48	0,48
65	5	0,54	0,49
	10	0,60	0,52
70	5	0,29	0,55
	10	0,31	0,54

La obtención de las fracciones S y S_φ, así como las condiciones de incubación son las detalladas en Métodos. Los errores en las determinaciones no exceden el 5 - 8%.

Luego del calentamiento a 70°C durante 5 min se inactivan completamente la Isomerasa y la URO-D de riñón (Figura R-II.2B), mientras que calentando a 65°C durante 10 min la fracción proveniente del hígado, se obtiene un 64% de uroporfirina I y se observa aún la formación de porfirinas de tipo isomérico III: uroporfirina III (14 %), heptaporfirina III (19 %) y coproporfirina III (3%) (Figura R-II.2A).

El análisis de los resultados obtenidos permite concluir que la temperatura óptima de calentamiento para la obtención de la PBG-D renal es de 70°C durante 5 min. En

cambio, para la enzima hepática se eligió 65°C durante 10 min, representando esta elección un compromiso entre la actividad específica y el tipo isomérico.

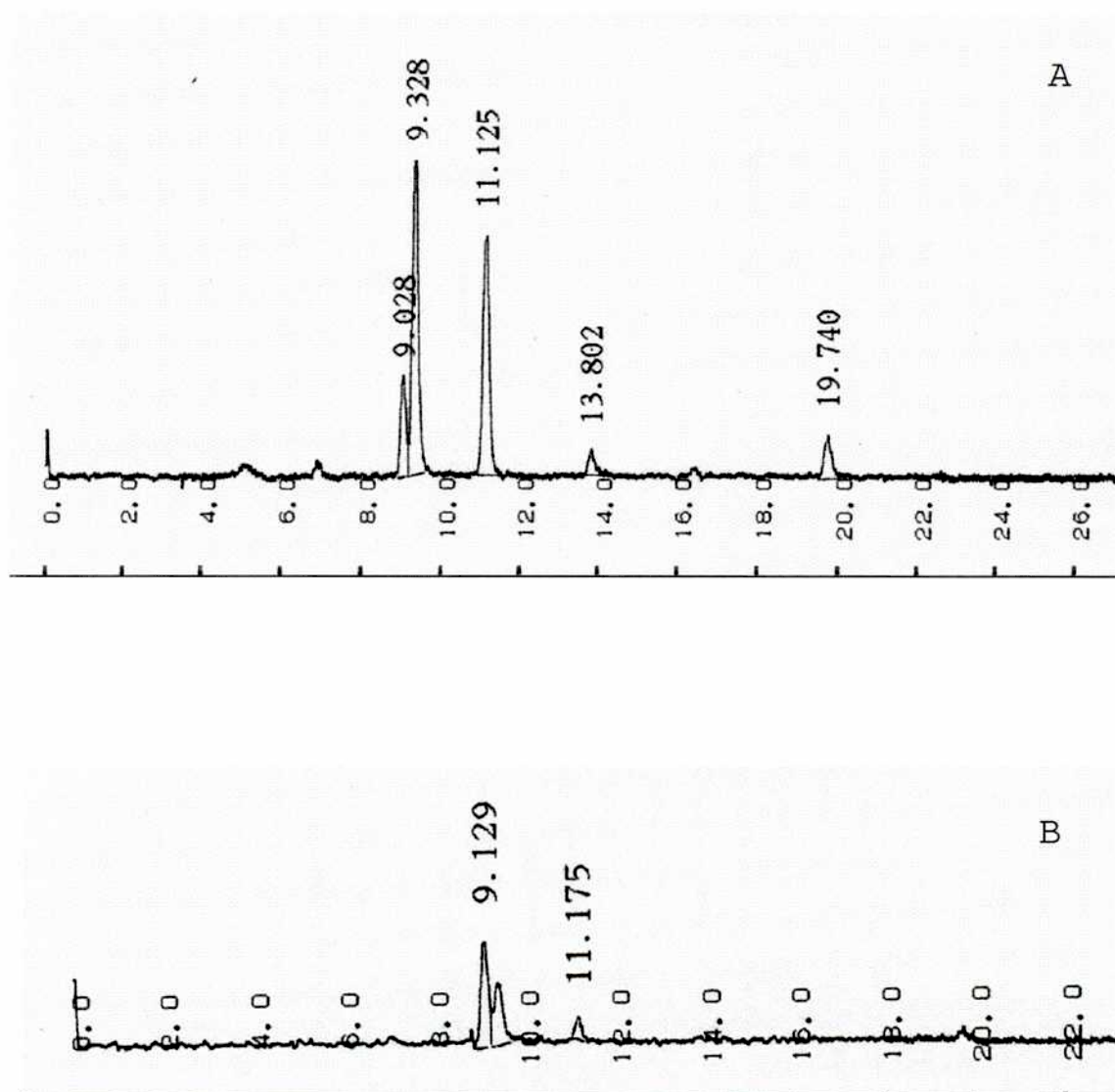


Figura R-II.1: Perfiles obtenidos por HPLC para las porfirinas sintetizadas en incubaciones llevadas a cabo con la fracción S de hígado (A) y riñón de rata (B). Las condiciones experimentales se describen en Métodos. Los tiempos de retención correspondientes se encuentran detallados en la Tabla M-II.2 de dicha sección.

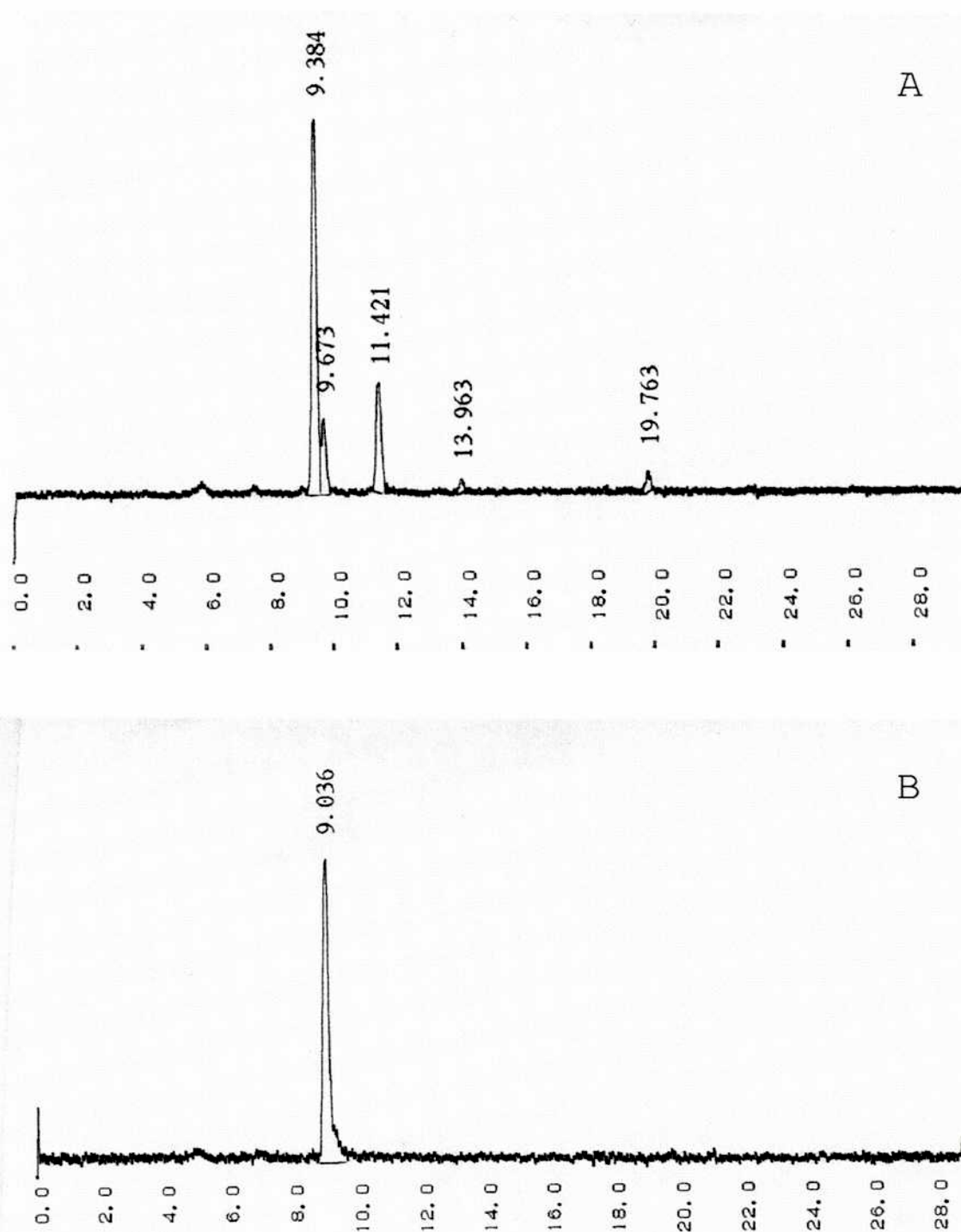


Figura R-II.2: Perfiles obtenidos por HPLC para las porfirinas sintetizadas en incubaciones llevadas a cabo con la fracción S de hígado calentada a 65°C durante 10 min (A) y con la fracción S de riñón de rata calentada a 70°C durante 5 min (B). Las condiciones experimentales se detallan en Métodos. Los tiempos de retención correspondientes se encuentran detallados en la Tabla M-II.2 de dicha sección.

II.1.3 Precipitación isoelectrica

Con frecuencia se ha empleado el ácido acético glacial para precipitar proteínas contaminantes en fracciones crudas. Con este fin se acidificó la fracción sobrenadante S hasta pH 5 con este ácido y se mantuvo con agitación constante durante 15 min. Luego se centrifugó durante 10 min a 24000xg y se midió la actividad de PBG-D en el sobrenadante llevado a pH 8,2. Este tratamiento produjo una fuerte inactivación de la enzima de ambas fuentes, tal como se observa en la Tabla R-II.2.

Tabla R-II.2: Efecto del tratamiento con AcOH glacial

Fuente enzimática	Fracción	Proteínas (mg)	Porfirinas formadas	
			Actividad (nmoles)	Ae (nmoles/mg)
Hígado	S	520	41,6	0,08
	S _{AcOH}	203	10,1	0,05
Riñón	S	661	66,1	0,10
	S _{AcOH}	315	3,1	0,01

S_{AcOH} : sobrenadante del tratamiento con AcOH glacial. La obtención del extracto enzimático y las condiciones de incubación están detalladas en Métodos. Los errores en las determinaciones no exceden el 5 - 8%.

II.2. Purificación de la PBG-D hepática

De acuerdo con los resultados obtenidos luego de realizar los ensayos preliminares para separar la enzima Isomerasa, se decidió emplear la siguiente secuencia de pasos a partir de la fracción Fs (ítem M-II.1) para la purificación de la PBG-D hepática (Tabla R-II.3). Las actividades enzimáticas se midieron en buffer Tris HCl 50 mM pH 8,2. Todas las operaciones se realizaron a 4°C.

- **Cromatografía en Sephadex G-100 (G-100):** 2 ml de la suspensión proteica proveniente de la fracción Fs (aproximadamente 30 mg de proteína) se sembraron en una columna de Sephadex G-100. La Figura R-II.3 muestra el perfil de elución. La actividad específica en el pico de actividad es 7 veces mayor que la de la etapa anterior.

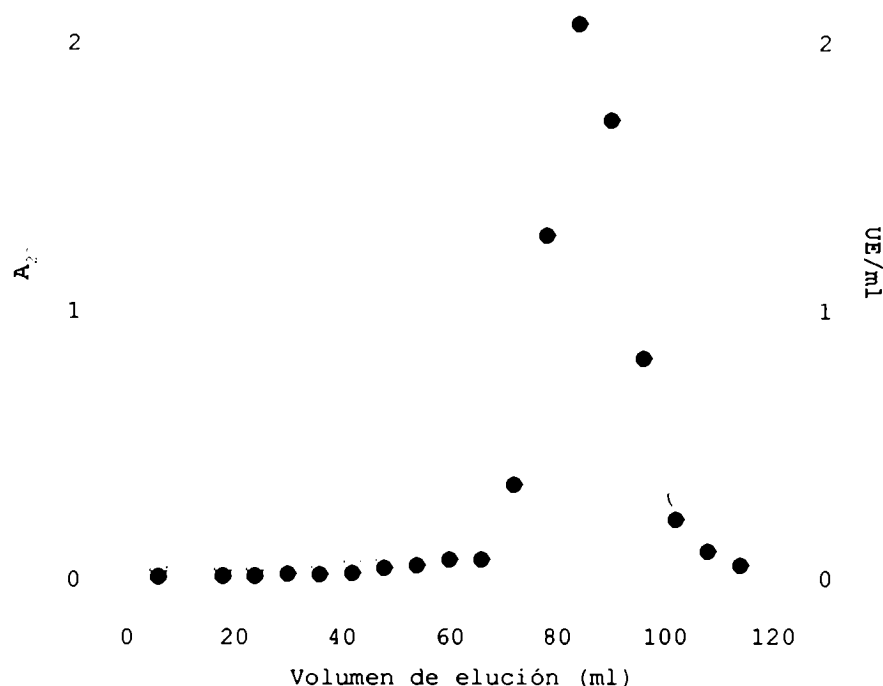


Figura R-II.3: Perfil de elución de la PBG-D de hígado de rata a través de una columna de Sephadex G-100. La proteína se eluyó empleando buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2 (fujo: 9ml/h). En los eluidos se determinó el contenido proteico (○) y la actividad enzimática (●). El sistema de incubación y la metodología empleada se describen en Métodos.

- **Cromatografía de intercambio iónico (Q-Seph.):** La fracción activa eluída en la etapa anterior se sembró en una columna de Q-Sepharosa equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2. La columna se lavó con este buffer y las proteínas se eluyeron aplicando un gradiente de NaCl (0-1,0 M) de acuerdo con lo descrito en Métodos. En las fracciones eluidas se midió la actividad de la enzima PBG-D y el contenido de proteínas totales, obteniéndose así el perfil de elución ilustrado en la Figura R-II.4.

La PBG-D eluye de la columna a una concentración comprendida entre 0,6-0,7M de NaCl y la actividad específica del pico de actividad es aproximadamente 3 veces mayor que la del paso anterior.

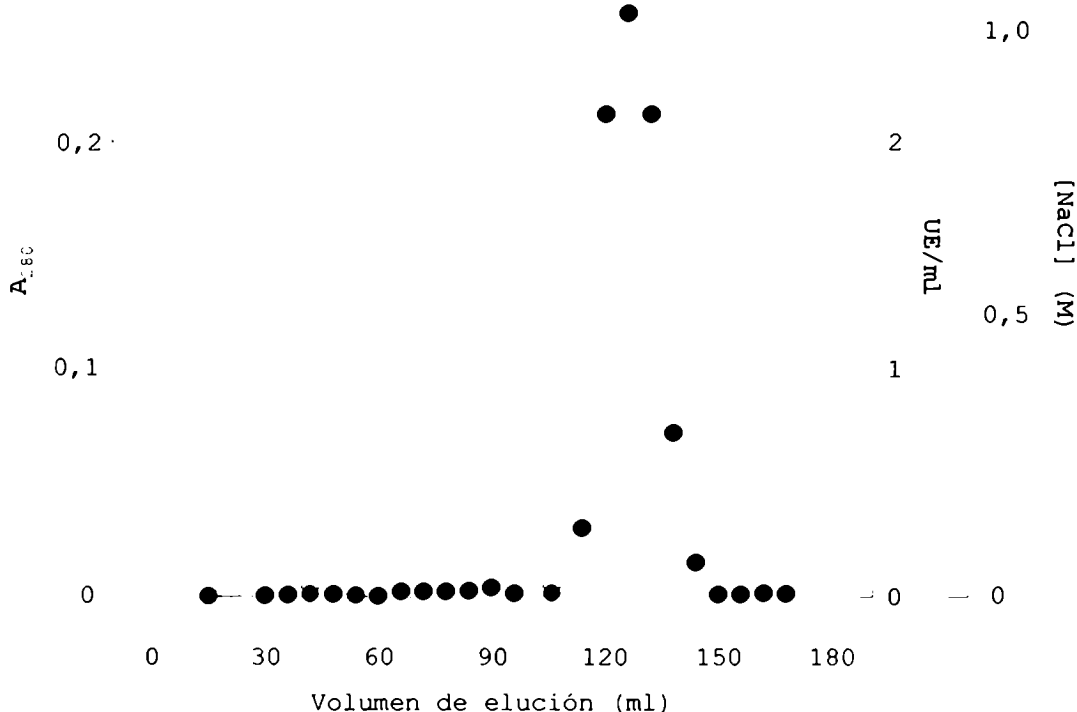


Figura R-II.4: Perfil de elución de la PBG-D de hígado de rata a través de una columna de Q-Sepharosa. La proteína se eluyó empleando un gradiente lineal de NaCl (0-1,0 M) (—) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2 (flujo: 45 ml/h). En los eluidos se determinó el contenido proteico (○) y la actividad enzimática (●). El sistema de incubación y la metodología empleada se describen en Métodos.

- **Cromatografía en Blue Sepharosa (B-Seph.):** La fracción enzimática obtenida en el paso anterior se desaló mediante diálisis contra buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,2 y se concentró en la forma descrita en Métodos hasta alcanzar un volumen final de aproximadamente 10 ml. Este extracto enzimático se sembró en una columna de Blue Sepharosa equilibrada con buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,2. Se efectuó un lavado con 30 ml del mismo buffer conteniendo NaCl 0,2 M y posteriormente se aplicó un gradiente lineal

de NaCl (0,2-1,0 M) en el mismo buffer. La PBG-D eluye con una fuerza iónica de 1,0 M de NaCl. La Figura R-II.5 muestra el perfil de elución correspondiente.

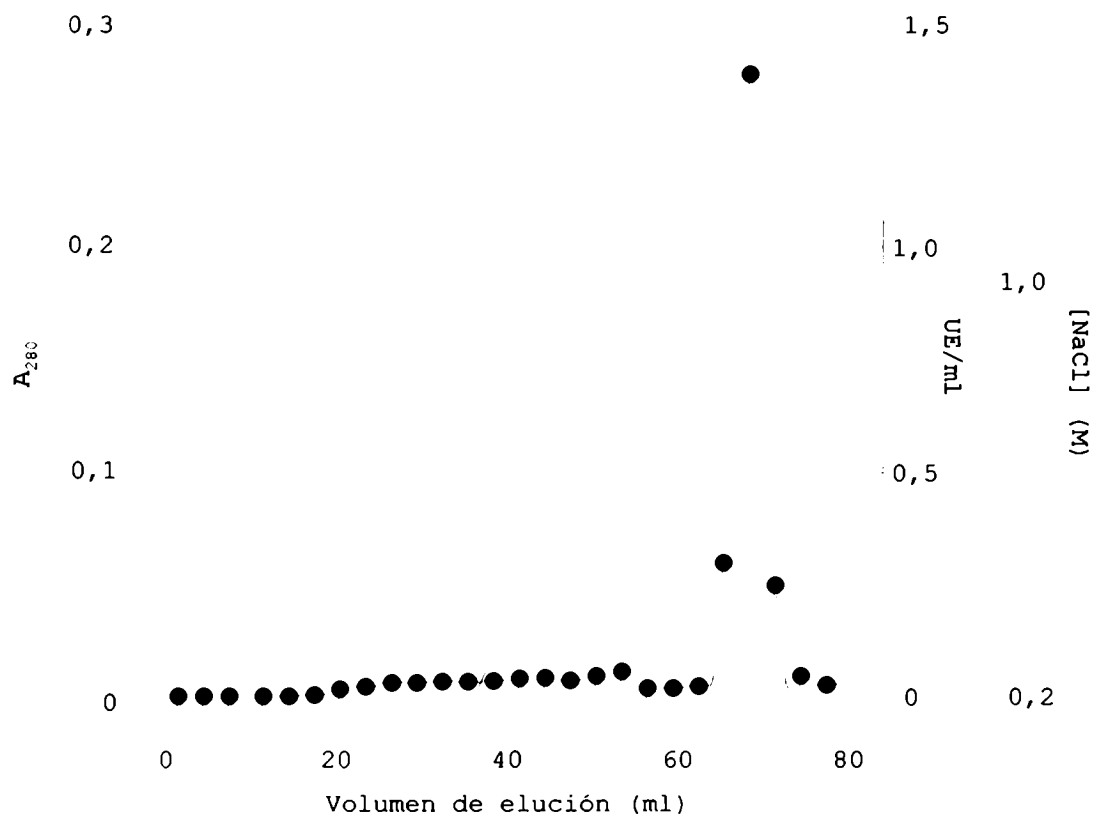


Figura R-II.5: Perfil de elución de la PBG-D de hígado de rata a través de una columna de Blue Sepharosa. La proteína se eluyó aplicando un gradiente lineal de NaCl (0,2-1,0 M) (—) en buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,2 (flujo: 18 ml/h). En los eluidos se determinó el contenido proteico (○) y la actividad enzimática (●). El sistema de incubación y la metodología empleada se describen en Métodos.

Tabla R-II.3: Cuadro de purificación de la PBG-D de hígado de rata

Etapa	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	UE/ml (nmoles/ml)	UE (nmoles)	Ae (nmoles/mg)	P	R (%)
H	290	13,10	0,71	206,0	0,05	1	100
S	284	8,02	0,64	182,0	0,08	1,6	88
S ₀	255	1,52	0,92	235,0	0,61	12,0	100
F _s	11	18,03	17,71	195,0	0,98	20,0	83
G-100	40	0,32	2,07	83,0	6,48	130,0	35
Q-Seph.	24	0,14	2,56	61,5	18,30	366,0	26
B-Seph.	3	0,04	1,38	4,1	34,17	683,0	2

Las unidades enzimáticas (UE) correspondientes a las tres primeras etapas de purificación fueron calculadas considerando las porfirinas totales sintetizadas por cada fracción. Los errores en las determinaciones no exceden el 5 - 8%. P: grado de purificación; R: rendimiento.

En la Tabla R-II.3 se muestran los datos totales correspondientes a la purificación de la PBG-D de hígado de rata. Se logró purificar la proteína 680 veces con un rendimiento del 2%, siendo la etapa del calentamiento la que produjo mayor purificación (7,6 veces). Por otro lado, a partir de la fracción F_s los incubados sintetizan un 100% de uroporfirina I, indicando la separación total de la Isomerasa y de la URO-D durante el fraccionamiento con sulfato de amonio. El incremento del 30% que se encuentra en las unidades totales comparando las fracciones S y S₀, ha sido también observado durante la purificación de esta proteína en otras fuentes y se ha sugerido que dicho incremento se debería a la inactivación de la Isomerasa, la cual dejaría de regular la actividad de la PBG-D (Batlle & Rossetti, 1977; Rossetti *et al.*, 1980; Fumagalli *et al.*, 1991).

II.3. Purificación de la PBG-D renal

La secuencia de pasos establecida para la purificación de la PBG-D de riñón de rata es la que se presenta en la Tabla R-II.4:

- **Cromatografía en Sephadex G-100 (G-100):** 2 ml de la suspensión proteica de la fracción Fs (aproximadamente 30 mg de proteína) se sembraron en una columna de Sephadex G-100. El perfil de elución se muestra en la Figura R-II.6. La actividad específica en el pico de actividad es 10 veces mayor que la actividad proveniente de la etapa anterior.

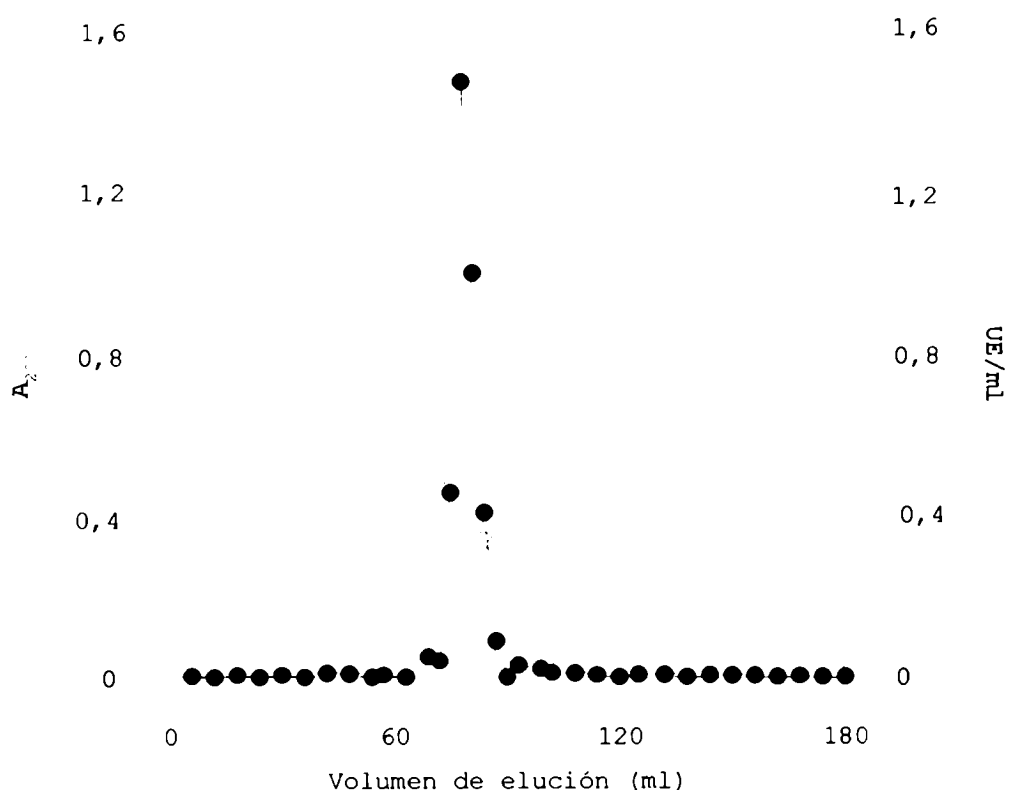


Figura R-II.6: Perfil de elución de la PBG-D de riñón de rata a través de una columna de Sephadex G-100. La proteína se eluyó empleando buffer Tris HCl 50 mM pH 8,2 (fujo: 9ml/h). En los eluidos se determinó el contenido proteico (O) y la actividad enzimática (●). El sistema de incubación y la metodología empleada se describen en Métodos.

- **Cromatografía de intercambio iónico (Q-Seph.):** La fracción activa eluída en la etapa anterior se sembró en una columna de Q-Sepharosa equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2. Las condiciones de elución son las mismas descritas para la enzima de hígado. La PBG-D eluye a una concentración comprendida entre 0,5-0,6 M de NaCl.

La Figura R-II.7 muestra el diagrama de elución, donde la actividad específica del pico de actividad es aproximadamente 3 veces mayor que la actividad correspondiente al paso anterior.

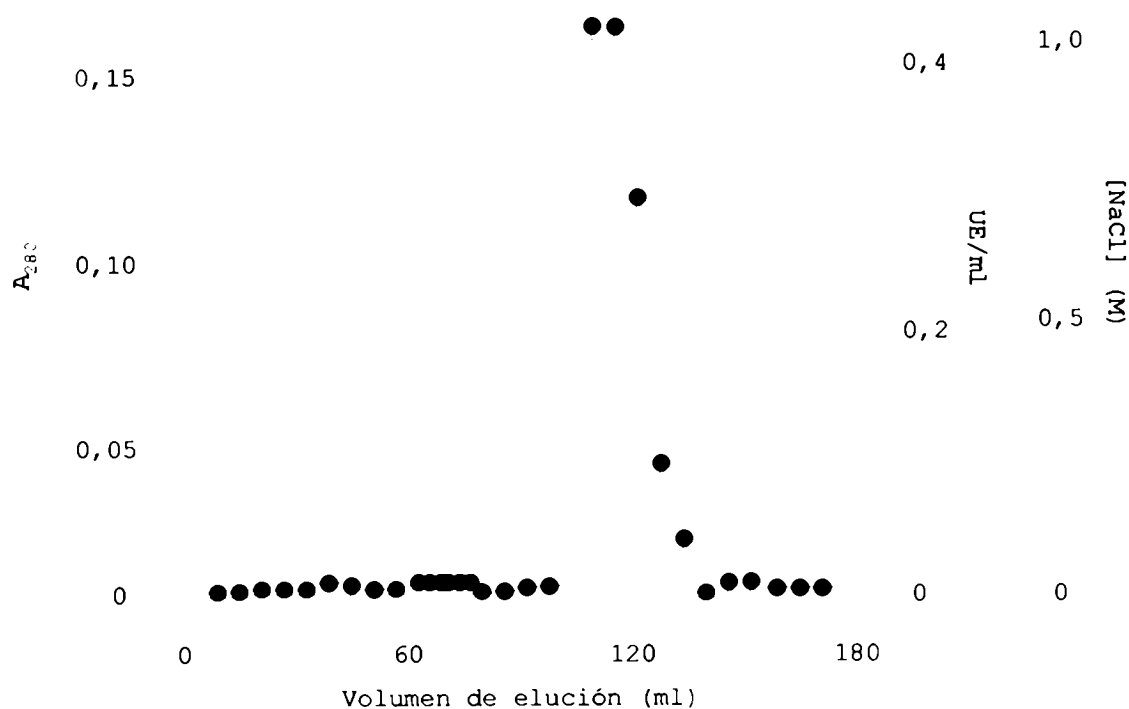


Figura R-II.7: Perfil de elución de la PBG-D de riñón de rata a través de una columna de Q-Sepharosa, equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2 (flujo: 45 ml/h). La proteína se eluyó empleando un gradiente lineal de NaCl (0-1,0 M) en el mismo buffer (—). En los eluidos se determinó el contenido proteico (O) y la actividad enzimática (●). El sistema de incubación y la metodología empleada se describen en Métodos.

- **Cromatografía en Blue Sepharosa (B-Seph.):** La fracción enzimática obtenida en el paso anterior se dializó contra buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,2 y se concentró en la forma descrita en Métodos hasta alcanzar un volumen final de aproximadamente 10 ml. Este extracto enzimático se sembró en una columna de Blue Sepharosa equilibrada con buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,2. Se efectuó un lavado con 30 ml del mismo buffer conteniendo NaCl 0,3 M. La elución de la proteína se realizó aplicando un gradiente lineal de NaCl (0,3-1,1 M) en el mismo buffer. La Figura R-II.8 muestra el perfil de elución. La máxima actividad de PBG-D eluye con una fuerza iónica de 1,1 M de NaCl.

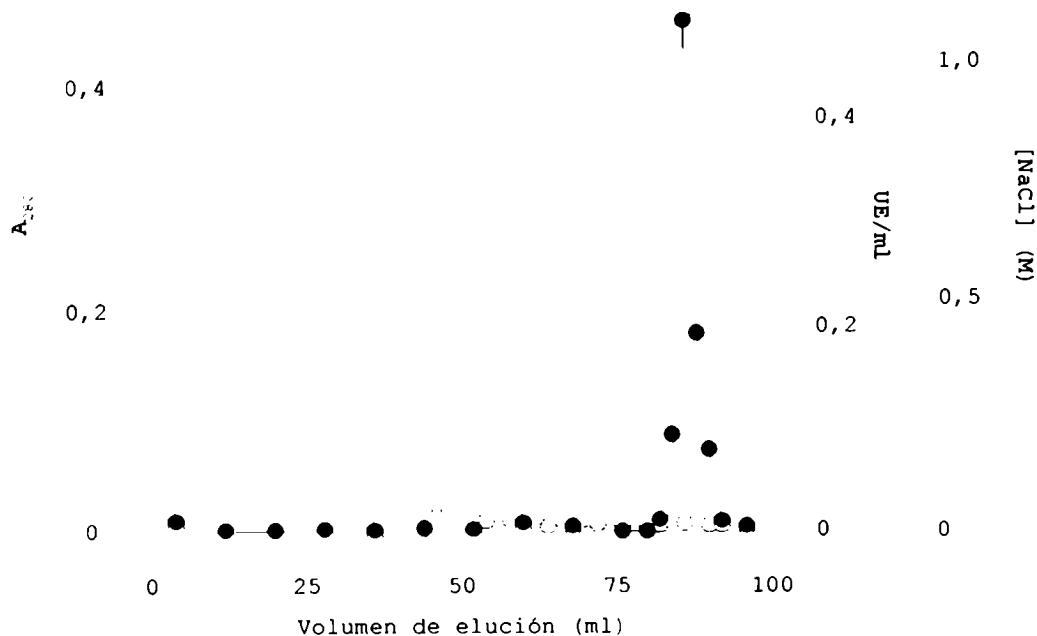


Figura R-II.8: Perfil de elución de la PBG-D de riñón de rata a través de una columna de Blue Sepharosa, equilibrada con buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,2 (flujo: 18 ml/h) y la proteína se eluyó aplicando un gradiente lineal de 0,3 a 1,1 M de NaCl (—) en el mismo buffer. En los eluidos se determinó el contenido proteico (○) y la actividad enzimática (●). El sistema de incubación y la metodología empleada se describen en Métodos.

Tabla R-II.4: Cuadro de purificación de la PBG-D de riñón de rata

Etapa	Volumen (ml)	Proteína (mg/ml)	UE/ml (nmoles/ml)	UE (nmoles)	Ae (nmol/mg)	P	R (%)
H	480	10,70	0,75	360	0,07	1,0	100
S	420	7,30	0,70	294	0,10	1,4	82,0
S ₀	388	1,70	0,86	334	0,51	7,3	100
Fs	32	13,50	9,69	310	0,72	10,3	93,0
G-100	96	0,11	1,47	141	13,35	191,0	42,0
Q-Seph.	84	0,02	0,43	36	21,43	306,0	11,0
B-Seph.	6	0,01	0,49	3	50,00	714,0	0,9

Las unidades enzimáticas (UE) correspondientes a las dos primeras etapas de purificación fueron calculadas considerando las porfirinas totales sintetizadas por cada fracción. Los errores en las determinaciones no exceden el 5 - 8%. P: grado de purificación; R: rendimiento.

En la Tabla R-II.4 se muestran los datos correspondientes a la purificación de la PBG-D de riñón de rata. Se obtuvo una fracción con una actividad específica de 50 nmoles de uroporfirina I/mg, purificada 710 veces con un rendimiento de 0,9%, siendo la etapa de la filtración molecular por Sephadex G-100 la que produjo una mayor purificación (19 veces).

II.4. Masa Molecular Relativa

II.4.1 Determinación de la Mr por cromatografía de exclusión molecular

Se determinó la Mr de ambas enzimas empleando cromatografía en Sephadex G-100. Para calibrar la columna se utilizaron como patrones, proteínas conocidas, de acuerdo con lo establecido en Métodos (ítem M-II.6.1). A partir del gráfico de $\log Mr$ vs K_{av} se estimaron las siguientes masas moleculares relativas: $41,7 \pm 4,2$ kDa y $39,8 \pm 4,0$ kDa para las enzimas hepática y renal respectivamente (Figura R-II.9). Estas Mr son del orden de las ya informadas para esta enzima de otras fuentes (Batlle & Rossetti, 1977; Juknat *et al.*, 1994; Witty *et al.*, 1996).

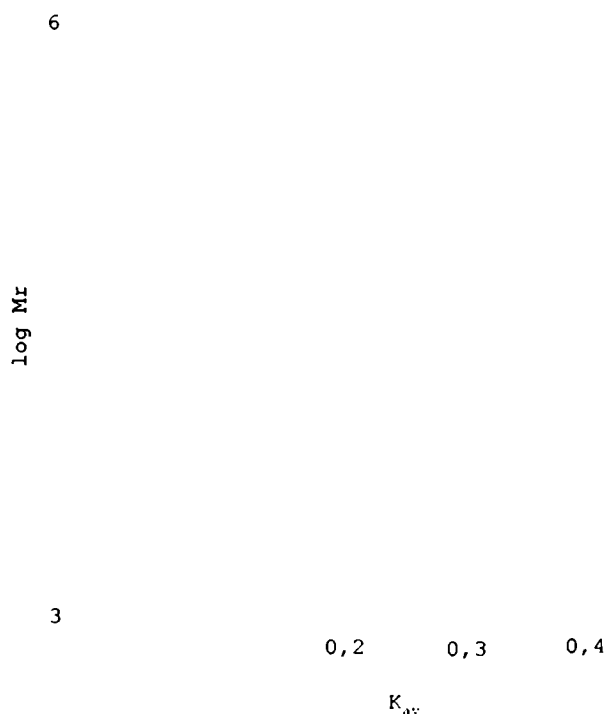


Figura R-II.9: Determinación de la masa molecular relativa de la PBG-D de hígado (□) y riñón (Δ) de rata. Las proteínas patrón empleadas en la curva de calibración son las descritas en Métodos (ítem M-II.6.1).

CAPITULO III

PBG-Deaminasa de hígado de rata Estudios Cinéticos

	Página
III.1. Introducción.....	128
III.2. Estudios de velocidades iniciales.....	128
III.3. Efecto de iones.....	131
III.3.1 Acción de una mezcla de NaCl-MgCl ₂	131
III.3.2 Efecto del ion sodio.....	132
III.3.3 Efecto del ion fosfato.....	133
III.3.4 Efecto del ion magnesio.....	139
III.3.5 Efecto del ion amonio.....	144
III.4. Efecto del ácido fólico.....	149
III.4.1 Efecto del ácido fólico sobre la actividad de distintas fracciones de PBG-D de hígado de rata.....	149
III.4.2 Efecto del ácido fólico sobre las propiedades cinéticas de la PBG-D de hígado de rata.....	153
III.5. Efecto de la sulfamerazina.....	156
III.5.1 Efecto de la sulfamerazina sobre las propiedades cinéticas de la PBG-D de hígado de rata.....	156

III. PBG-DEAMINASA DE HIGADO DE RATA

ESTUDIOS CINETICOS

III.1. Introducción

El objetivo de esta etapa consistió en determinar los parámetros cinéticos de la PBG-D de hígado de rata, mediante el estudio de velocidades iniciales y analizar el comportamiento de distintos efectores sobre la cinética de la reacción.

III.2. Estudio de velocidades iniciales

Estudios realizados con PBG-D proveniente de diversas fuentes revelaron el comportamiento michaeliano de la misma. Sin embargo, Llambías & Batlle (1971) encontraron que en callos de soya, esta enzima presentaba una cooperatividad negativa, mientras que Fumagalli *et al.*, (1985) demostraron la existencia de efectos cooperativos positivos débiles en eritrocitos humanos.

La Figura R-III.1 muestra los típicos gráficos de formación de producto en función del tiempo (0 - 60 min.), para concentraciones de sustrato comprendidas entre 4 y 66 μM .

De las pendientes se calcularon las velocidades iniciales, las cuales se graficaron en función de la concentración de PBG. La curva de saturación exhibe un perfil hiperbólico (Figura R-I.3A), el gráfico de inversas de Lineweaver-Burk (Figura R-III.2) es lineal y el coeficiente de Hill es 1 (Figura R-III.2, inset). Estos resultados indican un comportamiento michaeliano para la PBG-D de hígado de rata. Los parámetros cinéticos aparentes calculados a pH 8,2 son los siguientes: $K_m = 12,0 \pm 1,4 \mu\text{M}$ y $V_m = 17,0 \pm 1,4 \text{ pmoles/mg.min.}$

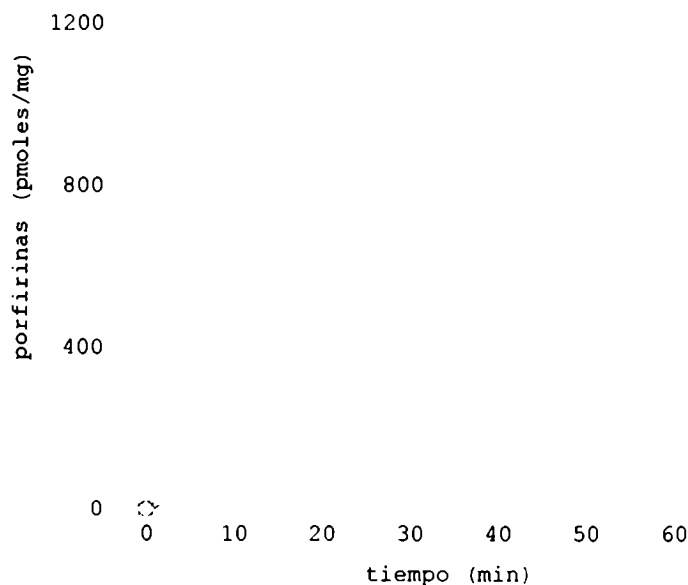


Figura R-III.1: Determinación de velocidades iniciales. Se midió la formación de porfirinas en función del tiempo en presencia de distintas concentraciones de PBG (○ 4 μ M, □ 11 μ M, Δ 22 μ M, ▽ 44 μ M y ◇ 66 μ M) (r : 0,998 - 0,999). La obtención del extracto enzimático Fs y el sistema de incubación empleado se detallan en Métodos.

El valor del K_m es del mismo orden del calculado para esta enzima en *Rhodopseudomonas sphaeroides* (20 μ M; Jordan & Shemin, 1973), *Escherichia coli* (19 μ M; Jordan *et al.*, 1988), *Saccharomices cerevisiae* (19 μ M; Correa García *et al.*, 1991), hígado porcino (10 μ M; Fumagalli *et al.*, 1991) y *Arabidopsis thaliana* (17 μ M; Jones & Jordan, 1994), entre otras fuentes.

Es bien sabido que las reacciones enzimáticas que involucran cuatro sustratos poseen expresiones de velocidades iniciales complejas y gráficos de dobles recíprocas no lineales (Elliot & Tipton, 1974). Esta no linealidad se presenta solamente cuando las moléculas de sustrato se unen a formas enzimáticas conectadas reversiblemente (Cleland, 1963).

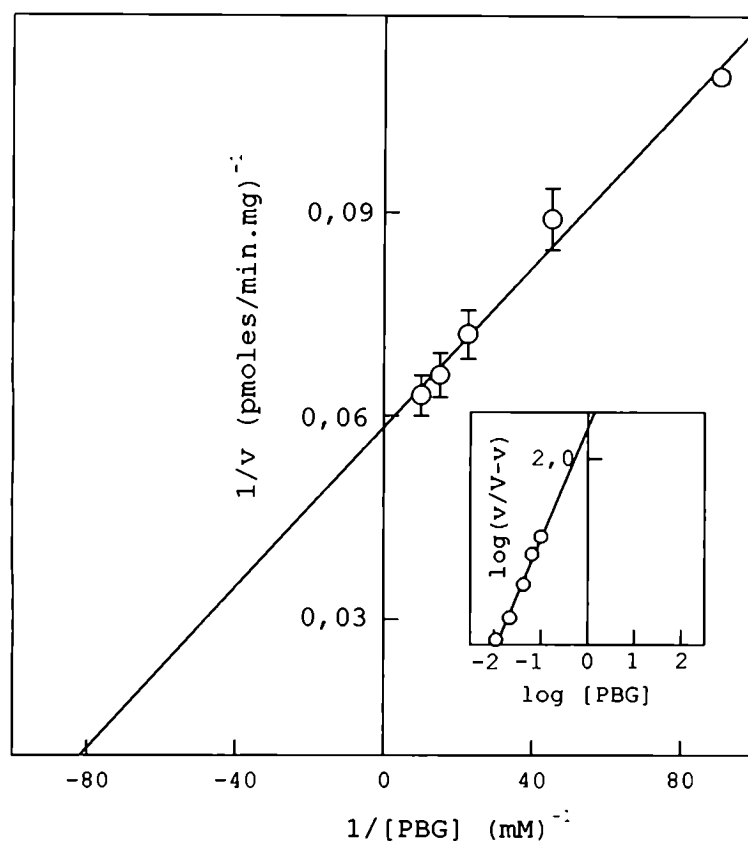


Figura R-III.2: Gráfico de Lineweaver-Burk para la PBG-D de hígado de rata. Las inversas fueron calculadas a partir de las velocidades iniciales obtenidas del gráfico de la [Figura R-III.1](#) ($r: 0,997$). **Inset:** Cálculo del n a partir del gráfico de Hill ($r: 0,990$).

En nuestro caso, a pesar de que el mecanismo de reacción de la PBG-D involucra cuatro moléculas del mismo sustrato, se obtuvo un gráfico de Lineweaver-Burk lineal, lo que indica una relación michaeliana entre la velocidad inicial de la reacción y la concentración de PBG. Este comportamiento es consistente con el mecanismo de desplazamiento secuencial, en el cual existen pasos cinéticos irreversibles, que en nuestra reacción estarían representados por la liberación de amonio.

III.3. Efecto de iones

III.3.1 Acción de una mezcla de NaCl - MgCl₂

Es bien sabido que la presencia de determinadas concentraciones de sodio y magnesio en el sistema de incubación produce una activación de la PBG-asa de hígado bovino, callos de soya y eritrocitos de ave, y paralelamente una inhibición de la actividad de la URO-D (Sancovich *et al.*, 1969; Llambías & Batlle, 1971). Resultó de interés investigar si estos iones presentan un comportamiento similar sobre la actividad de la PBG-D de hígado de rata y si eventualmente pueden influir sobre la cinética de la reacción.

Se empleó una mezcla de NaCl 0,6 M y MgCl₂ 0,12 M (1:1; v:v) y se ensayó su efecto sobre las fracciones H, S, S₀ y F_s. La Tabla R-III.1 ilustra los resultados obtenidos agregando 0,2 y 0,4 ml de dicha mezcla al sistema de incubación.

Se observa un importante efecto activante (50 - 60%) respecto al control incubado en ausencia de la mezcla, en aquellas fracciones donde está presente la Cosintetasa, mientras que a partir de la etapa de calentamiento se manifiesta una inhibición del 30 % para el mayor volumen de mezcla utilizado.

El efecto estimulante que se observa en las incubaciones de las fracciones H y S se debería a que esta mezcla produce una activación a nivel del complejo PBG-asa. Dado que en estas experiencias se han medido porfirinas totales sintetizadas, no se puede descartar el efecto inhibitorio sobre la enzima URO-D, aún presente en dichas fracciones crudas. En la etapa de calentamiento, la URO-D se desnaturaliza, junto con la Cosintetasa (Figura R-II.2A), y la mezcla de iones ejercería su acción inhibitoria solamente sobre la actividad de la enzima PBG-D.

Tabla R-III.1: Efecto de una mezcla de NaCl y MgCl₂

Fracción	Porfirinas formadas (nmoles /mg)		
	NaCl + MgCl ₂ (ml)		
	0	0,2	0,4
H	0,05	0,08	0,08
S	0,08	0,11	0,12
S ₀	0,60	0,52	0,42
F _s	0,94	0,77	0,67

La obtención de las fracciones H, S, S₀ y F_s, así como el sistema de incubación empleado se detallan en Métodos. Las concentraciones finales de sodio y magnesio fueron de 60 mM y 12 mM (0,2 ml) y 120 mM y 24 mM (0,4 ml) respectivamente. Los errores en las determinaciones de las actividades no exceden el 5-8%.

III.3.2 Efecto del ion sodio

Para determinar si la inhibición ejercida por la mezcla se debía a la presencia de Na⁺, se estudió la acción de distintas concentraciones de este ion bajo sus formas cloruro, acetato y fosfato.

Los datos presentados en la Figura R-III.3 indican que las concentraciones de Na⁺ (0 - 150 mM) en su forma acetato, no modifican la actividad de esta enzima. La sal de cloruro inhibe en un 25% respecto al control, cuando su concentración es 150 mM. En cambio, el fosfato diácido de sodio es un importante inhibidor de la síntesis de uroporfirinógenos. Esta inhibición alcanza un 97% cuando la concentración de este anión se encuentra en el rango de 120 - 150 mM. Al estudiar el efecto del buffer de extracción sobre la actividad enzimática, ya habíamos observado que la PBG-D de hígado era más activa en buffer Tris-HCl que en buffer fosfato de sodio (Tabla R-I.2), indicando una posible inhibición por parte de este último buffer.

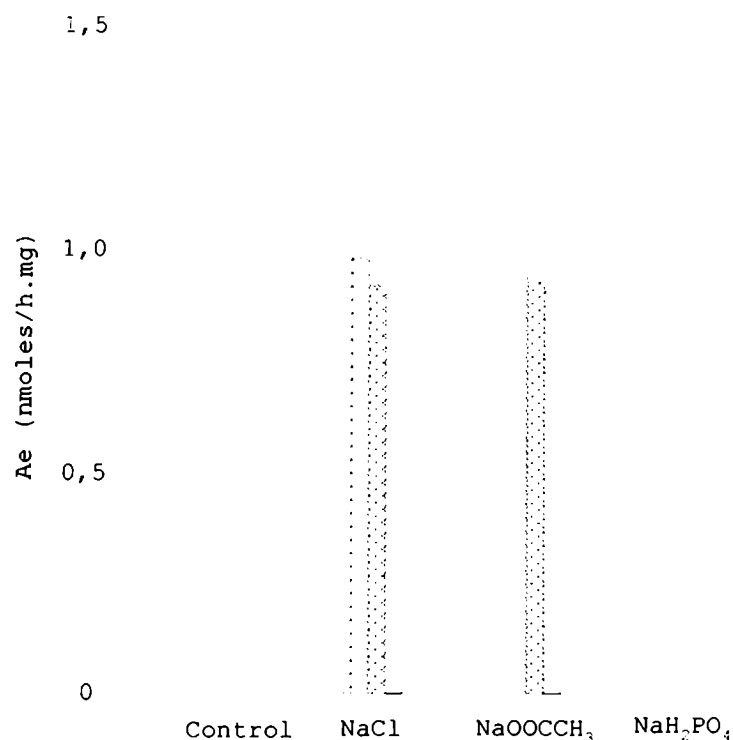


Figura R-III.3: Efecto del ion sodio. La obtención de la fracción Fs y el sistema de incubación se detallan en Métodos. Las actividades se midieron en ausencia ($\square$) y en presencia de sales de cloruro, acetato y fosfato diácido de sodio, en las siguientes concentraciones: 50 mM (diagonal lines), 100 mM (cross-hatch), 120 mM (diagonal lines) y 150 mM (horizontal lines).

III.3.3 Efecto del ion fosfato

Debido a la respuesta que presenta la actividad de la PBG-D de hígado de rata frente al fosfato diácido de sodio, se decidió caracterizar esta inhibición. En primer lugar se establecieron las concentraciones óptimas del inhibidor a emplear en los estudios de velocidades iniciales. De acuerdo con los resultados obtenidos (*Figura R-III.4; inset*) se alcanza un 60% de inhibición a una concentración de fosfato diácido de 20 mM. Se decidió entonces efectuar los estudios cinéticos empleando las siguientes concentraciones de NaPO₄H₂ : 10, 15 y 20 mM.

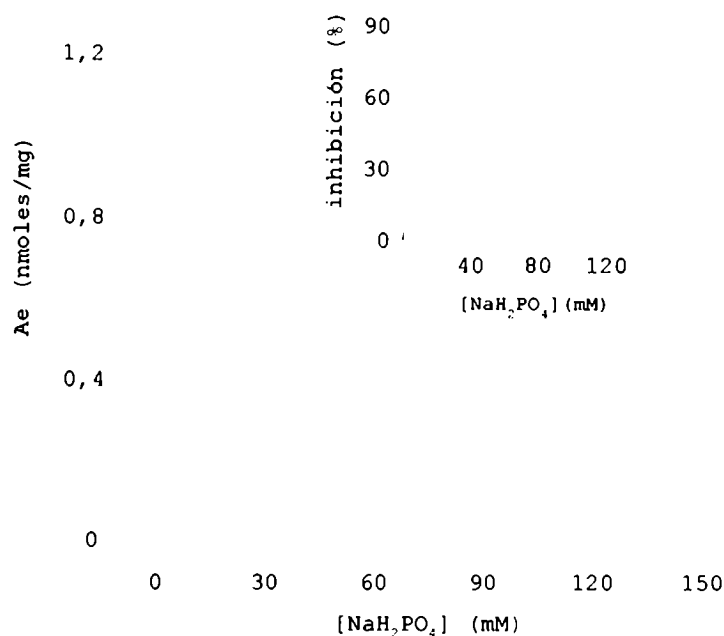


Figura R-III.4: Efecto de distintas concentraciones de NaH_2PO_4 sobre la actividad de la PBG-D de hígado de rata. Se incubó de acuerdo con lo detallado en Métodos, utilizando una concentración saturante de PBG de $66 \mu\text{M}$.

La Figura R-III.5 muestra que en incubaciones con distintas concentraciones de PBG (0 - $66 \mu\text{M}$), la presencia de fosfato diácido (0-20 mM) disminuye la formación de porfirinas pero sin alterar el tipo de curva.

El gráfico de Hanes-Woolf (Figura R-III.6) nos indica que el fosfato actúa como un inhibidor incompetitivo (Segel, 1975). Sin embargo la máxima concentración ensayada del inhibidor muestra un comportamiento inusual; mientras el K_m y la V_m disminuyen, lo cual es correcto en una inhibición de este tipo, su cociente que debe permanecer constante, también disminuye (Tabla R-III.2), indicando una desviación del comportamiento descripto.

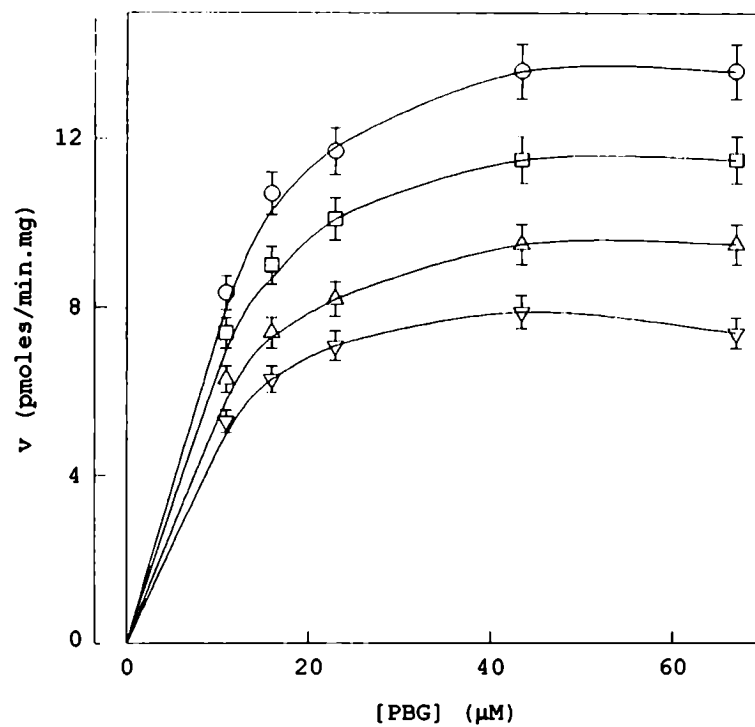


Figura R-III.5: Efecto del agregado de distintas concentraciones de NaH_2PO_4 sobre la actividad de la PBG-D de hígado de rata. Se midieron las velocidades iniciales (v), en ausencia (O) y en presencia del inhibidor ($\square$ 10 mM; Δ 15 mM; ∇ 20 mM).

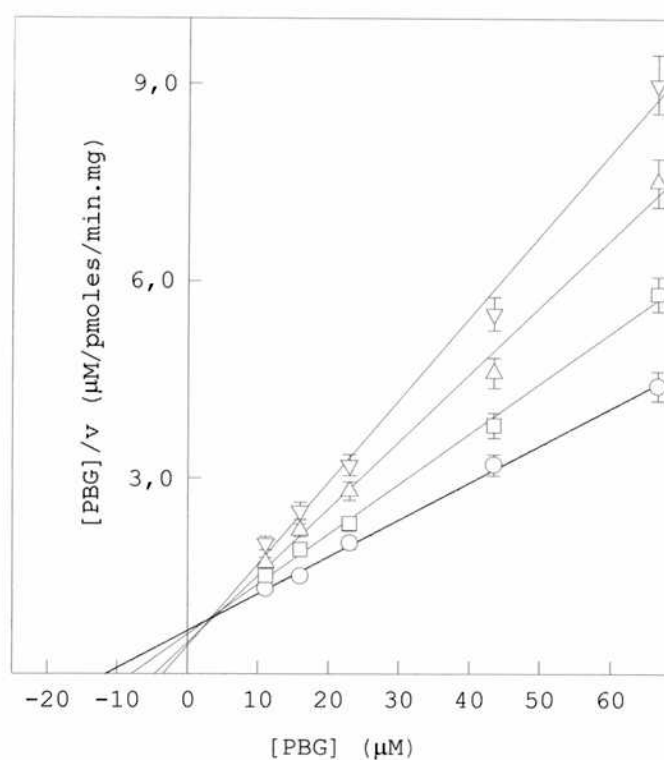


Figura R-III.6: Gráfico de Hanes-Woolf. Se regraficaron los datos experimentales correspondientes a la Figura R-III.5. Las velocidades iniciales (v) se midieron en ausencia (O) ($r: 0,998$) y en presencia del inhibidor ($\square$ 10 mM; Δ 15 mM; ∇ 20 mM) ($r: 0,992-0,998$).

Tabla R-III.2: Efecto del fosfato diácido de sodio sobre los parámetros cinéticos de la PBG-D de hígado de rata

Sistema	Km (μM)	Vm (pmoles/min.mg)	Coefficiente de Hill
control	$12,1 \pm 1,4$	$18,3 \pm 0,9$	1
[H ₂ PO ₄ ⁻] 10 mM	$8,6 \pm 1,0$	$16,6 \pm 0,8$	1
15 mM	$6,4 \pm 0,8$	$10,9 \pm 0,5$	1
20 mM	$3,2 \pm 0,4$	$8,2 \pm 0,4$	1

Los coeficientes n se calcularon de las pendientes de los gráficos de Hill de $\log (v/V_m - v)$ en función de $\log [\text{PBG}]$.

La linealización de Cornish-Bowden (1974) ([Figura R-III.7](#)) permite corroborar la inhibición incompetitiva y del cruce de las rectas se puede calcular la constante de disociación del complejo ESI ($K_i: 25 \pm 2 \text{ mM}$).

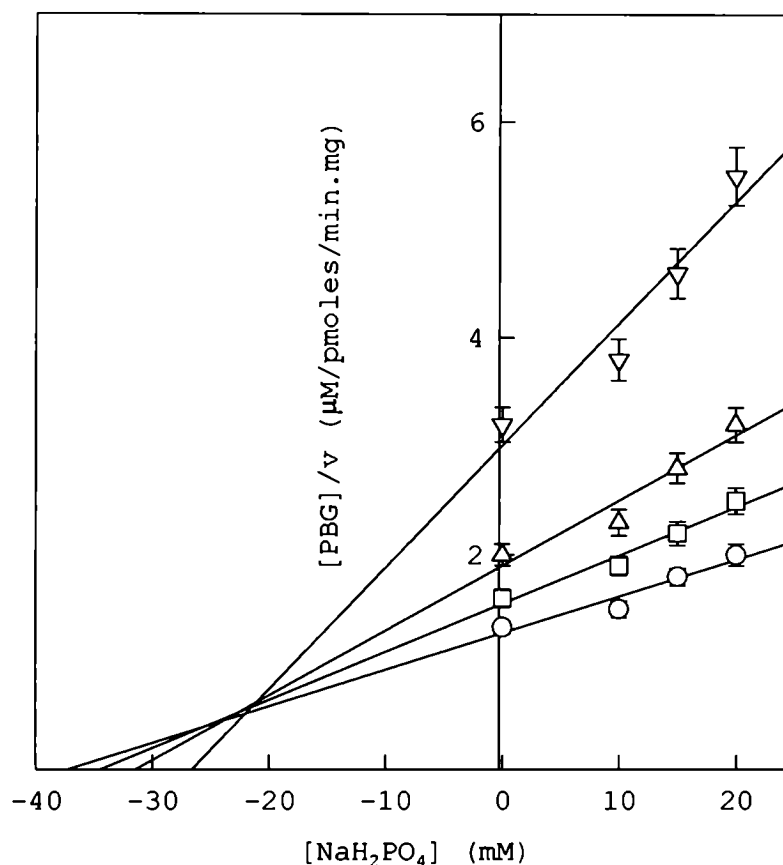


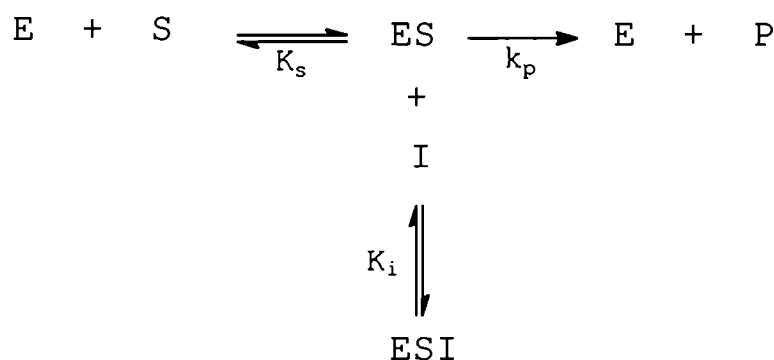
Figura R-III.7: Linealización de Cornish-Bowden. Se regraficaron los datos experimentales en función de la concentración del inhibidor. Las concentraciones de sustrato empleadas fueron las siguientes: O 11 µM; □ 16 µM; Δ 23 µM y ▽ 43,5 µM ($r: 0,967 - 0,998$).

Se observa nuevamente una desviación del comportamiento, pero esta vez a la mayor concentración de sustrato ensayada (43,5 µM).

Esta desviación del comportamiento incompetitivo observado al incrementarse en el sistema de incubación tanto la concentración de sustrato como del inhibidor fosfato, indicaría la existencia de fenómenos de interacción entre las porfirinas y el fosfato, los que estarían modificando negativamente la liberación del hidroximetilbilano. Cambios en

el tipo de inhibición al aumentar la concentración de fosfato, ya habían sido descriptos para la misma enzima de *Rhodopseudomonas palustris* (Kotler *et al.*, 1987b).

Considerando un solo sustrato, un inhibidor incompetitivo clásico se une reversiblemente al complejo ES para formar la especie ESI, catalíticamente inactiva (Esquema R-III.1). Según esta inhibición, la presencia de una cierta cantidad de I siempre originará la formación del complejo ESI, independientemente de la concentración de sustrato. En consecuencia la V_m disminuye. Además el equilibrio está desplazado hacia la formación de ES, por lo tanto también disminuye el K_m , pero en el mismo grado que lo hace la V_m , de tal forma que el cociente K_m / V_m permanece independiente de la concentración del inhibidor.



Esquema R-III.1: Reacciones involucradas en una inhibición incompetitiva clásica

La inhibición incompetitiva es poco frecuente en reacciones con un solo sustrato (Cornish & Bowden, 1986) pero tengamos en cuenta que la PBG-D emplea 4 moléculas de PBG, por lo tanto los efectos de este inhibidor sobre la cinética de esta enzima son más complejos que los correspondientes a un modelo de un solo sustrato.

Se han identificado 12 residuos arginina altamente conservados, en la estructura de la PBG-D de *Escherichia coli* (Jordan & Woodcock, 1991). Mediante estudios de mutagénesis dirigida, se observó que algunos de estos residuos están comprometidos en la unión del cofactor dipirrometano y otros están involucrados en la iniciación y propagación de la polimerización del PBG. La mutante obtenida al reemplazar la arginina

232 por una histidina demostró su incapacidad para convertir el complejo ES en ES₂ y el ES₂ en ES₃ (Jordan & Woodcock, 1991).

Se ha postulado que las cadenas laterales de acetato y propionato del PBG interactúan con las cargas positivas de los residuos arginina presentes en el sitio activo, lo cual permitiría estabilizar la formación de los intermediarios. El ion fosfato neutralizaría en parte estas cargas positivas, aumentando la formación de los complejos ESI-ES₄I e inhibiendo la polimerización y formación de producto final. La inhibición incompetitiva ejercida por el anión fosfato ya fue reportada en nuestro laboratorio, cuando se estudió la acción de dicho efector sobre la cinética de la PBG-asa de *Rp. palustris* (Juknat, 1983) y de la PBG-D de la misma fuente (Kotler *et al.*, 1987b).

III.3.4 Efecto del ion magnesio

Dado que el sodio no modifica la actividad de la PBG-D de hígado de rata (Figura R-III.3), resta por analizar el efecto del Mg⁺⁺ en su forma cloruro. La Figura R-III.8; inset muestra que se alcanza una inhibición del 88% cuando la concentración de este catión se encuentra en el sistema de incubación en el rango 150 - 200 mM.

Con el propósito de caracterizar esta inhibición se incubó la fracción F_s a distintos tiempos, en presencia de diferentes concentraciones de PBG (0 - 66 µM) y de magnesio (30, 55 y 80 mM) y se calcularon las velocidades iniciales. La Figura R-III.9 muestra los típicos gráficos de velocidad inicial vs [PBG], donde se observa que la presencia de concentraciones crecientes de ion Mg⁺⁺ disminuye la formación de porfirinas.

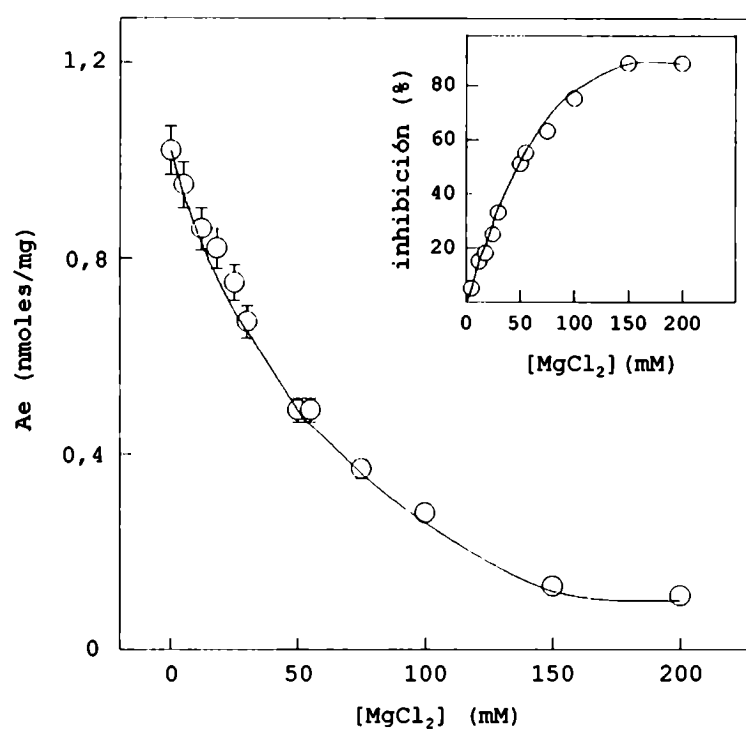


Figura R-III.8: Efecto de distintas concentraciones de Mg^{++} sobre la actividad de la PBG-D de hígado de rata. La obtención del extracto enzimático F, y las condiciones de incubación se encuentran detallados en Métodos. Se empleó una concentración saturante de sustrato de 66 μM .

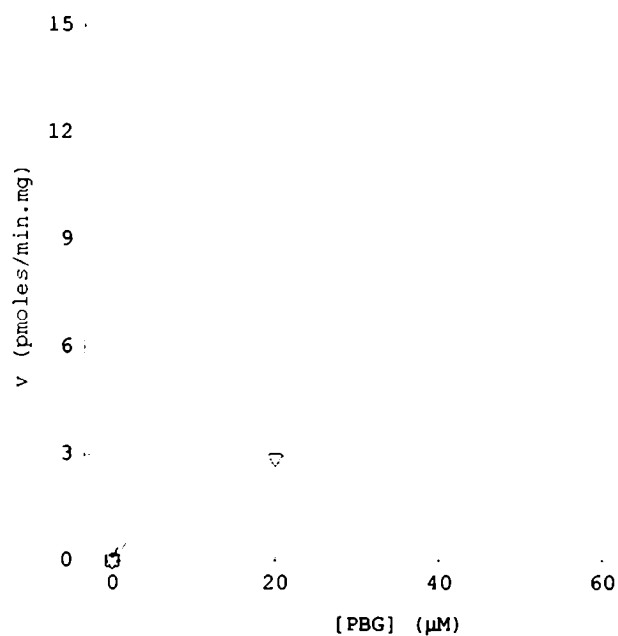


Figura R-III.9: Efecto de distintas concentraciones de MgCl_2 sobre la actividad de la PBG-D de hígado de rata. Se midieron las velocidades iniciales v en ausencia (O) y en presencia del inhibidor (□ 30 mM; Δ 55 mM; ∇ 80mM). Las condiciones experimentales se detallan en Métodos.

Estos resultados se representaron en gráficos de Hanes-Woolf (Figura R-III.10), pudiéndose deducir que el Mg^{++} actúa como un inhibidor incompetitivo. En la Tabla R-III.3 se muestran las constantes cinéticas calculadas a partir de dicho gráfico.

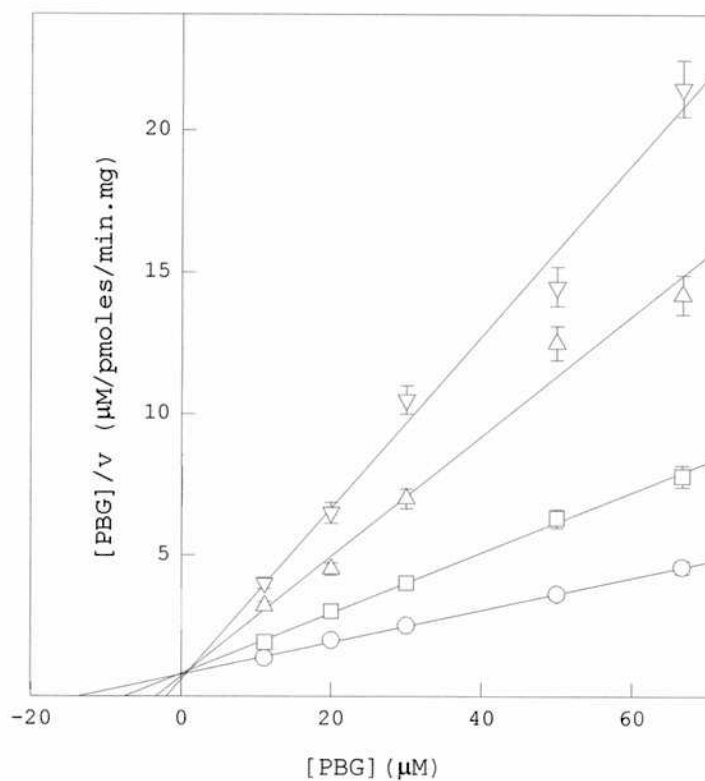


Figura R-III.10: Gráfico de Hanes-Woolf. Se midieron las velocidades iniciales v , en ausencia (O) (0,998) y en presencia del inhibidor ($\square$ 30 mM; Δ 55 mM; ∇ 80mM) (r : 0,988 - 0,997). Las condiciones experimentales se detallan en Métodos.

Tabla R-III.3: Efecto del Mg^{++} sobre las constantes cinéticas de la PBG-D de hígado de rata

Sistema	Km (μ M)	Vm (pmoles /min.mg)	Coefficiente de Hill
control	$13,60 \pm 0,16$	$17,7 \pm 0,9$	1
$[Mg^{++}]$ 30 mM	$7,50 \pm 0,90$	$9,4 \pm 0,5$	1
55 mM	$2,30 \pm 0,28$	$4,4 \pm 0,2$	1
80 mM	$1,80 \pm 0,22$	$3,0 \pm 0,2$	1

Los coeficientes n se calcularon a partir de las pendientes de los gráficos de Hill.

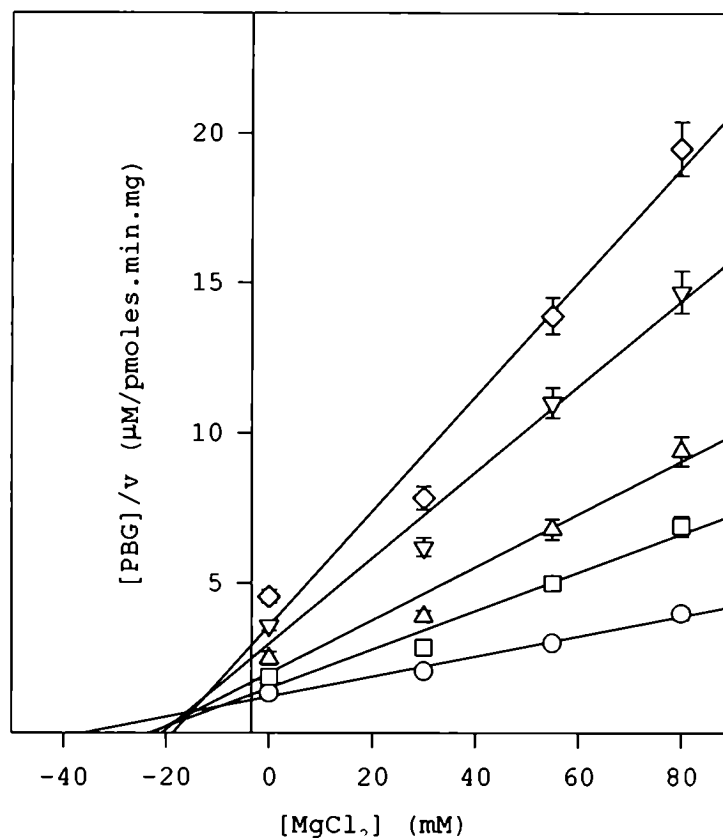


Figura R-III.11: Gráfico de Cornish-Bowden. Se regraficaron los datos de $[PBG]/v$ en función de la concentración del inhibidor; $[PBG]$: ○ 11 mM, □ 20 mM, Δ 30 mM, ▽ 50 mM y ◇ 66 mM (r : 0,972 - 0,992).

La linealización de Cornish-Bowden (**Figura R-III.11**) permite confirmar que la inhibición ejercida por el Mg^{++} es de tipo incompetitiva, con una constante de disociación K_i correspondiente al complejo ESI, de $14,0 \pm 3,4$ mM.

Los resultados obtenidos acerca de la inhibición incompetitiva ejercida por el Mg^{++} sobre la actividad de la PBG-D de hígado de rata resultan sumamente llamativos. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que el magnesio ejerce un efecto dual sobre la PBG-D de *Rp. palustris* (Kotler *et al.*, 1987b), comportándose como activador e inhibidor no competitivo, a bajas y altas concentraciones

respectivamente y dependiendo la magnitud de estos efectos de la concentración de PBG presente durante la incubación.

Según se ha expresado en el ítem anterior, la inhibición incompetitiva no es frecuente (Cornish-Bowden, 1986). Existen en la literatura pocos mecanismos en los cuales un producto de una reacción y más difícilmente un compuesto no involucrado en la reacción, exhiban inhibiciones incompetitivas. Como ejemplo del primer caso se puede nombrar la enzima Xantina oxidasa (Radi *et al.*, 1992), cuyo producto, el ácido úrico (10-65 μM) inhibe incompetitivamente a la misma, por unión con la forma enzimática correspondiente a la proteína reducida.

Como ejemplos de compuestos no involucrados en el mecanismo de reacción, se encuentran la L-fenilalanina (5 - 15 mM) y el tiouracilo (0,01 - 10 μM) que inhiben en forma incompetitiva las enzimas fosfatasa alcalina de intestino de rata (Gosh & Fishman, 1966) e iodotironina-5'-deiodinasa de hígado de rata (Visser, 1980) respectivamente.

Los efectos incompetitivos no son imposibles mecanísticamente pero serían muy perjudiciales para las células, pues originarían intermediarios dead-end con caminos sin salida. Para evitar este daño celular, las enzimas habrían evolucionado hacia estructuras que no favorecerían este tipo de inhibición *in vivo* (Cornish-Bowden, 1986).

En base a los resultados aquí presentados, se decidió no incluir la mezcla salina de NaCl + MgCl₂, en el sistema de incubación de las fracciones enzimáticas obtenidas posteriormente a la etapa de calentamiento.

III.3.5 Efecto del ion amonio

Fue Bogorad (1962) quien observó por primera vez la inhibición de la actividad de la PBG-D en presencia de ciertas concentraciones de ion amonio, los cuales actuarían modificando la etapa de ciclación e isomerización y afectando la cantidad total y/o el tipo isomérico de las porfirinas formadas. La inhibición por amonio fue estudiada

posteriormente en diversas fuentes (Sancovich *et al.*, 1969; Llambías & Batlle, 1971a,b; Kotler *et al.*, 1987b; Fumagalli *et al.*, 1991; Jones & Jordan, 1994).

Con estos antecedentes resultó de interés estudiar el efecto del ion amonio en su forma cloruro, sobre la cinética de la PBG-D de hígado de rata. Por lo tanto, se llevó a cabo un ensayo previo en el que se analizó el comportamiento de la enzima frente a cantidades crecientes de amonio (10 - 50 mM), empleando una concentración saturante de PBG de 66 μ M (Figura R-III.12). Se observa que la inhibición aumenta con la concentración del efector, alcanzando un 42% para la mayor concentración de NH_4^+ empleada.

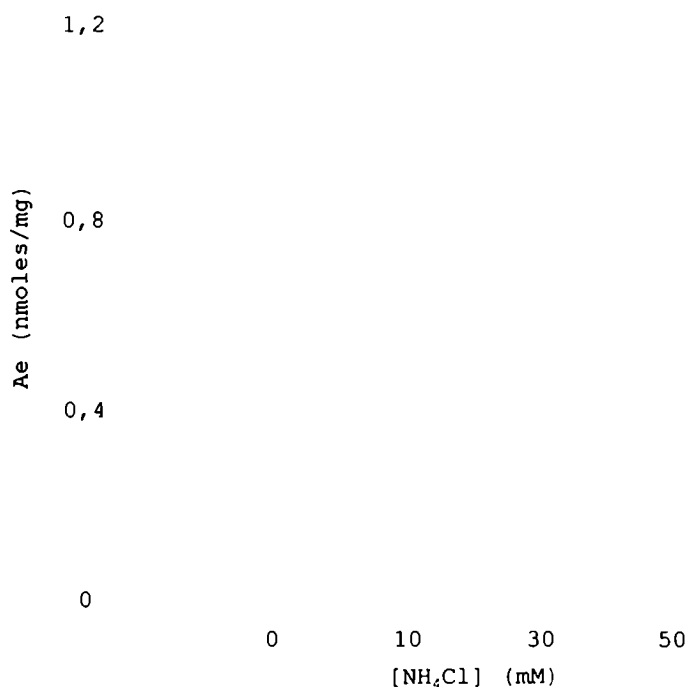


Figura R-III.12: Efecto de distintas concentraciones del ion amonio sobre la actividad de la PBG-D de hígado de rata. La obtención de la fracción enzimática F_s y las condiciones de incubación se detallan en Métodos. * $p < 0,01$; ** $p < 0,005$

Con el fin de estudiar la cinética de la reacción en presencia de amonio, se midieron velocidades iniciales variando la concentración de PBG (0 - 66 μM) en presencia de 25 y 50 mM de amonio. La Figura R-III.13 muestra los gráficos de dobles recíprocas, que revelan que el amonio se comporta como un inhibidor no competitivo, ya que no sólo afecta la velocidad máxima, sino también el cociente K_m/V_m .

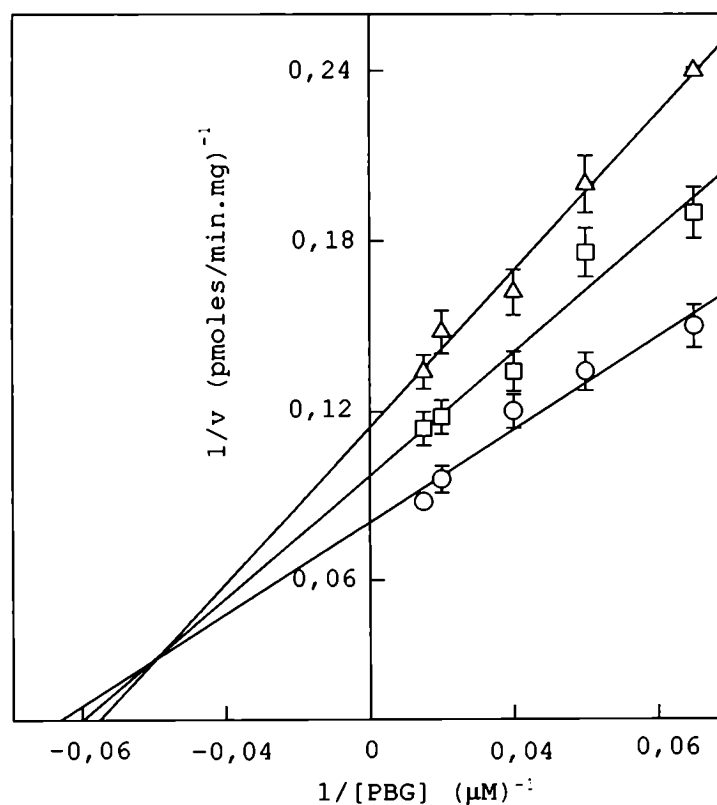


Figura R-III.13: Gráfico de Lineweaver-Burk. Se midieron las velocidades iniciales v y se graficaron las dobles recíprocas, correspondientes a ausencia (○) (r : 0,985) y presencia de NH_4^+ 25 mM (□) (r : 0,981) y 50 mM (Δ) (r : 0,996).

Tabla R-III.4: Efecto del amonio sobre las constantes cinéticas de la PBG-D de hígado de rata

Sistema	Km (μM)	Vm (pmoles /min.mg)	Coeficiente de Hill
control	$13,6 \pm 1,6$	$15,2 \pm 0,8$	1
$[\text{NH}_4^+]$ 25 mM	$14,3 \pm 1,7$	$12,0 \pm 0,6$	1
50 mM	$15,0 \pm 1,8$	$10,0 \pm 0,5$	1

Los coeficientes n se calcularon de las pendientes de los gráficos de Hill.

En la Tabla R-III.4 se encuentran las constantes cinéticas calculadas a partir del gráfico de la Figura R-III.13.

Regraficando las intersecciones y las pendientes de la Figura R-III.13 en función de las concentraciones del inhibidor (Figura R-III.14A,B), se establece que la inhibición no competitiva es de tipo lineal y se obtienen los siguientes valores de constantes de disociación: K_{ii} : 90,0 mM y K_{ip} : 63,3 mM, donde K_{ii} y K_{ip} representan las constantes de inhibición que afectan la intersección y la pendiente respectivamente.

El hecho de que la inhibición sea de tipo lineal nos está indicando que el inhibidor se une a una sola forma enzimática o a varias no conectadas reversiblemente (Cleland, 1963). En nuestro caso, la irreversibilidad está dada por la liberación de amonio.

Los presentes resultados están de acuerdo con la hipótesis de Battersby *et al.*, (1983) quienes sugirieron la formación de un intermediario azafulveno durante el transcurso de la reacción. Este compuesto se transforma en el hidroximetilbilano por acción de una molécula de agua. Los nucleófilos tales como las bases nitrogenadas, y en nuestro caso el amonio, competirían con el agua por el azafulveno, acumulando entonces

en el medio aminometilbilanos moderadamente estables e impidiendo la síntesis final de uroporfirinógenos.

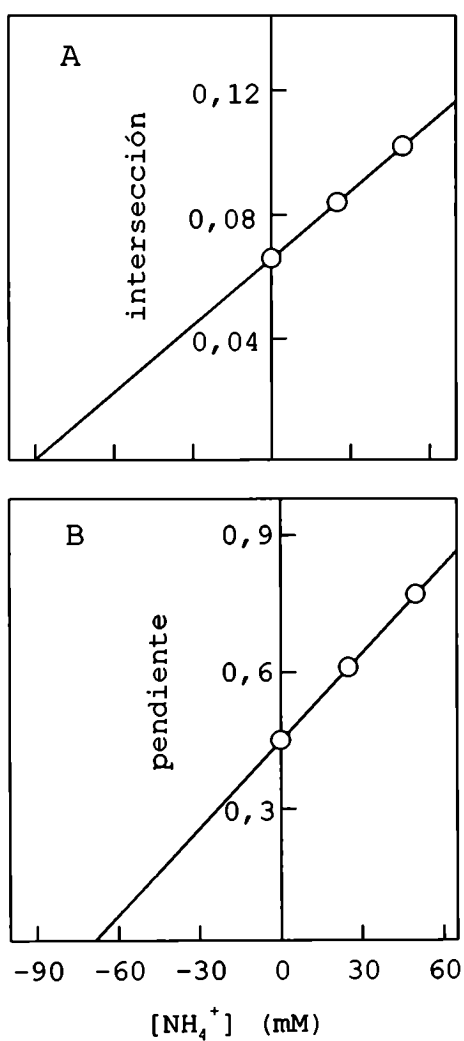


Figura R-III.14: Variación de la intersección (A) ($r: 0,999$) y la pendiente (B) ($r: 0,999$), calculadas del gráfico de dobles recíprocas (Figura R-III.13), en función de la concentración de NH_4^+ .

III.4 Efecto del ácido fólico

Los folatos son una familia de compuestos que poseen en su estructura un anillo pteridínico unido a un p-aminobenzoato que está acoplado a una cadena que contiene entre 1 y 7 restos glutámicos. Su principal función fisiológica es el transporte de grupos con un átomo de carbono para la síntesis de nucleótidos. Los derivados del pteroilglutamato actúan como cofactores de diversas enzimas.

Estudios realizados con fracciones citosólicas de hígado de rata revelaron la presencia de una molécula de bajo peso molecular, estable al calor, que poseía efecto protector sobre la PBG-D frente a la inhibición por plomo (Tephly, 1976). Paralelamente se sugirió que dicho factor podría tener una estructura similar a un pteroilglutamato (Piper & van Lier, 1977). Juknat *et al.* (1981) detectaron y aislaron un factor regulador de las actividades de la PBG-asa y de la PBG-D de *Euglena gracilis*. Este factor puede separarse de las fracciones crudas por calentamiento o por cromatografía a través de una columna de Sephadex G-25. El efecto activante de este compuesto de bajo peso molecular resultó comparable con el que produce el ácido fólico a una concentración 10^{-7} M. Utilizando técnicas de filtración por geles, intercambio iónico y cromatografía en papel se purificó este factor (Juknat *et al.*, 1988a) y posteriormente se determinó mediante FTIR y ^1H -RMN que su estructura correspondía a una 6 biopterina (Juknat *et al.*, 1988b). Por otra parte Kohashi *et al.* (1984) encontraron que un pteroilglutamato reducido estaba asociado a la Cosintetasa de hígado de rata y sugirieron que debía actuar como cofactor en la biosíntesis de uroporfirinógeno III. Sin embargo Hart & Battersby (1985) y Smythe & Williams (1988) no encontraron derivados del folato ni ningún otro cofactor en preparaciones puras de Cosintetasa de *Euglena gracilis* e hígado de rata respectivamente. Por otro lado, Christenson *et al.*, (1986) y Kotler *et al.*, (1988) han postulado la existencia de un sitio de unión para el folato en la PBG-D.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, resultó de interés investigar más detalladamente el efecto producido *in vitro* por el ácido fólico sobre la PBG-D de hígado de rata.

III.4.1 Efecto del ácido fólico sobre la actividad de distintas fracciones de PBG-D de hígado de rata

Utilizando la fracción F_s como extracto enzimático se estudió el efecto de distintas concentraciones de ácido fólico (0,5-2,0 mM) sobre la actividad de la PBG-D a concentración de sustrato saturante (66 μ M).

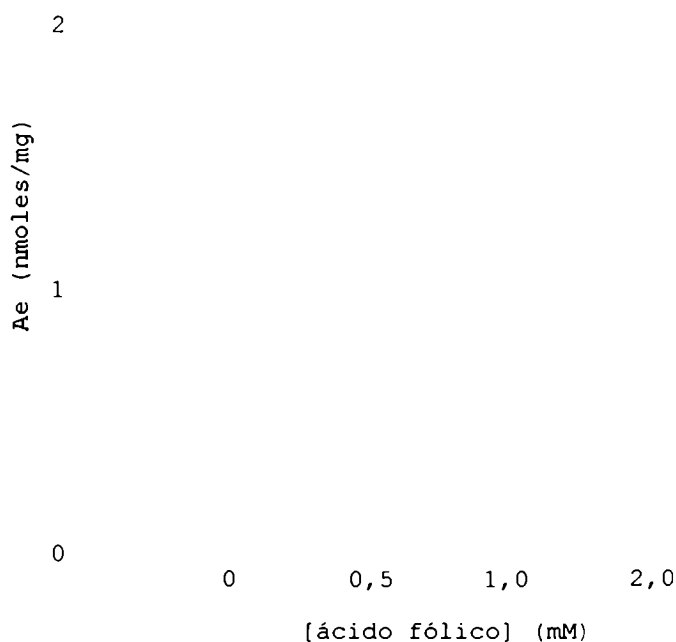


Figura R-III.15: Efecto de distintas concentraciones de ácido fólico sobre la actividad de la PBG-D de hígado de rata. La obtención del extracto enzimático F_s y las condiciones de incubación se detallan en Métodos. ** $p < 0,005$

La Figura R-III.15 nos muestra que una concentración de ácido fólico 2,0 mM produce una activación del 43% respecto al control. Piper & van Lier (1977) ya habían encontrado una significativa estimulación de la actividad de la PBG-D de hígado de rata en incubaciones llevadas a cabo en presencia de ácido fólico 100 μ M. Sin embargo, no

observaron cambios en la síntesis de uroporfirinógeno I en presencia de pteroilglutamato 1 mM.

Posteriormente se analizó el efecto del ácido fólico 2,0 mM sobre distintas fracciones de PBG-D (Figura R-III.16), en incubaciones manteniendo la concentración de PBG saturante.

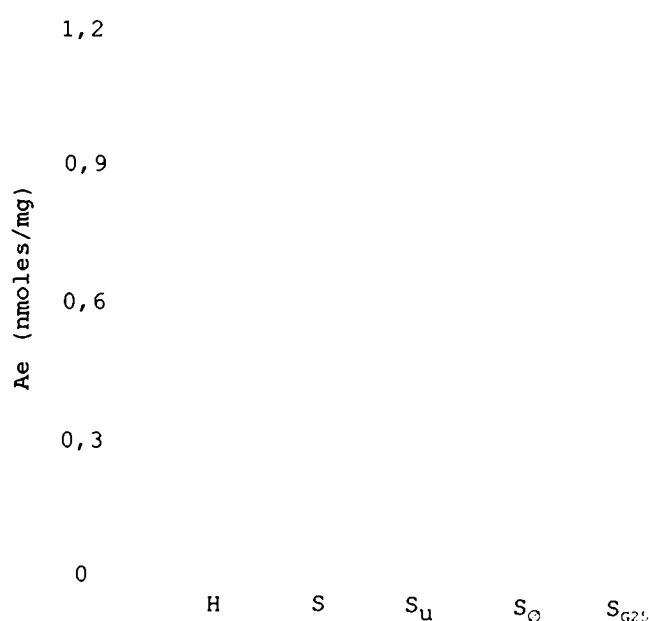


Figura R-III.16: Efecto del ácido fólico 2,0 mM sobre distintas fracciones enzimáticas. La obtención de las fracciones y el sistema de incubación se detallan en Métodos. Se determinó la actividad específica en ausencia ($\square$) y en presencia de ácido fólico (▨). ** $p < 0,005$

El ácido fólico no activa la síntesis de porfirinas ni en las fracciones que poseen actividad de Cosintetasa (H, S y S_u) ni en el sobrenadante del calentamiento (S₀). Sin embargo, en las incubaciones realizadas con la fracción F_s desalada empleando cromatografía con Sephadex G-25 (S_{G25}) o mediante diálisis (D), el ácido fólico provocó un aumento de la actividad del 34 y 43% respectivamente.

Estos resultados sugieren que dependiendo de la fracción enzimática utilizada, este compuesto dispondría o no de sitios de unión libres para expresar su efecto estimulante (Noriega *et al.*, 1992).

Para determinar si en las fracciones S y S₀ habría sitios disponibles para este activador, pero que se encontraran ocupados, se cromatografiaron estos extractos en una columna de Sephadex G-25. Los eluidos se denominaron PrS y PrS₀ respectivamente. La Figura R-III 17 indica que el ácido fólico a una concentración 2,0 mM no tiene efecto sobre estas fracciones.

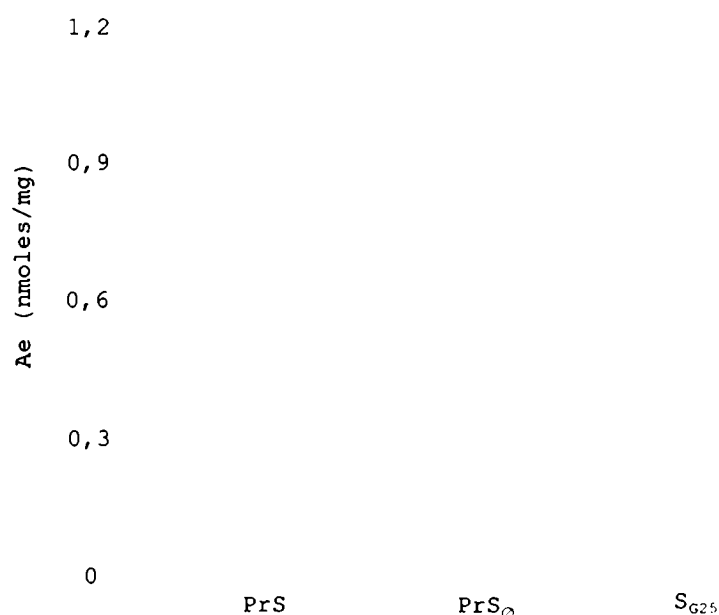


Figura R-III.17: Efecto del ácido fólico 2,0 mM sobre las fracciones S y S₀ cromatografiadas a través de una columna de Sephadex G-25 grueso. Actividad específica en ausencia (□) y en presencia de ácido fólico (▨). ** $p < 0,005$

Estos datos indicarían que es necesaria la presencia previa de una fuerza iónica alta para que el ácido fólico pueda expresar su efecto activante sobre la PBG-D de hígado de rata (Noriega *et al.*, 1992).

Los resultados obtenidos al emplear las fracciones libres de Cosintetasa (S_0 y Pr_0) sugieren que existirían sitios de unión saturados para este activador o bien un estado conformacional en el cual los grupos funcionales involucrados en la unión del ácido fólico no se encontraran expuestos o bien no sean fácilmente accesibles al activador (Noriega *et al.*, 1992).

III.4.2 Efecto del ácido fólico sobre las propiedades cinéticas de la PBG-D de hígado de rata

Teniendo en cuenta la interesante respuesta de la PBG-D de hígado frente al ácido fólico, se estudió el efecto del mismo sobre la cinética de la reacción.

Empleando la fracción F_s como extracto enzimático se llevaron a cabo incubaciones en ausencia y en presencia del efector (0,5 - 2,0 mM), utilizando concentraciones variables de PBG (0 - 50 μ M). En el gráfico de dobles recíprocas (Figura R-III.18) se aprecia que este compuesto aumenta la V_m sin afectar el K_m ($12,0 \pm 1,4 \mu$ M). El ácido fólico se comporta como un activador no esencial de la reacción, ya que la misma puede proceder aún en ausencia del efector (Esquema R-III.2) (Segel, 1975).

A partir de la Figura R-III.18 se obtuvieron las pendientes y las intersecciones, cuyas inversas se graficaron en función de $1/[\text{ácido fólico}]$ (Figura R-III.19). Los regráficos son lineales, con pendientes positivas, que confirman el efecto activante del ácido fólico y la unión de una molécula del activador al sitio activo. El gráfico de la Figura R-III.19 nos permite calcular la constante de disociación del complejo ES (K_s), la de unión del efector a la proteína (K_A) y las constantes α y β que dan cuenta de los cambios que experimentan los parámetros K_m y V_m respectivamente, en presencia del activador.

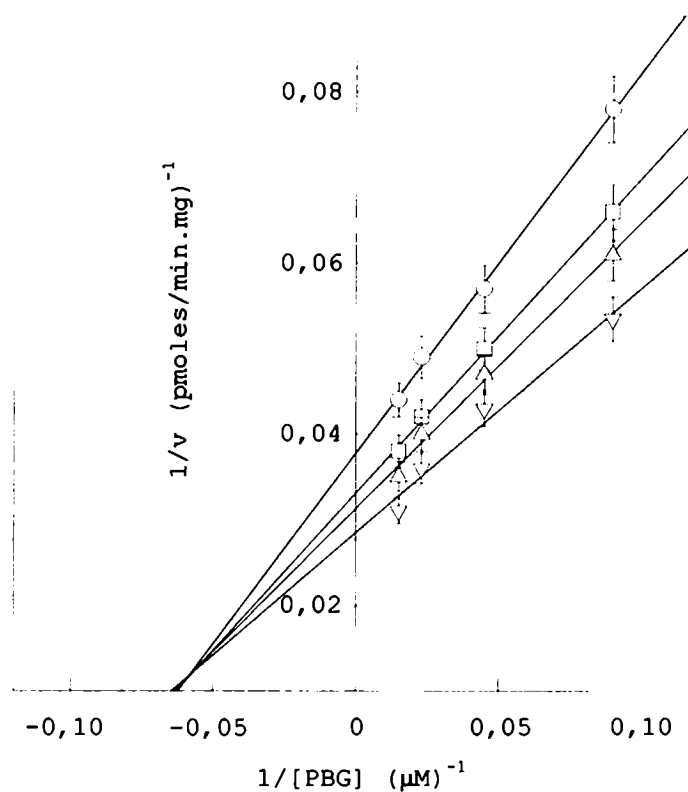
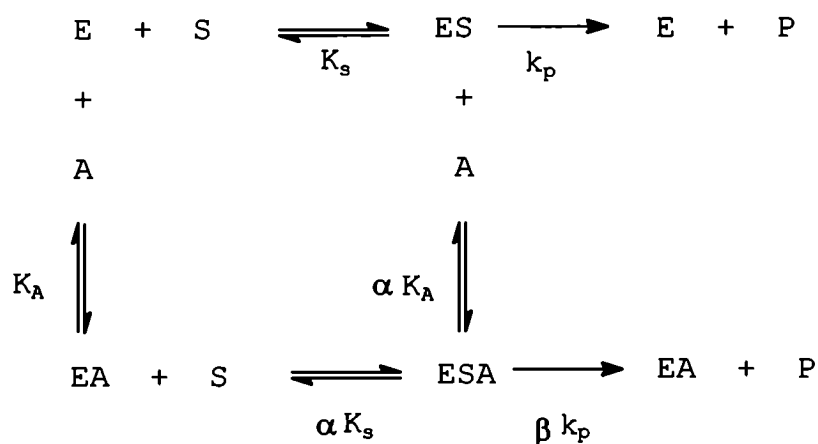


Figura R-III.18: Cinética de la activación de la PBG-D de hígado de rata por ácido fólico. Se graficaron las inversas calculadas en ausencia (O) (0,997) y en presencia de distintas concentraciones de ácido fólico (□ 0,5 mM, Δ 1,0 mM, ▽ 2,0 mM) (r : 0,981 - 0,991).



Esquema R-III.2: Modelo para una activación no esencial propuesto por Segel (1975), donde A representa el ácido fólico y S el sustrato PBG.

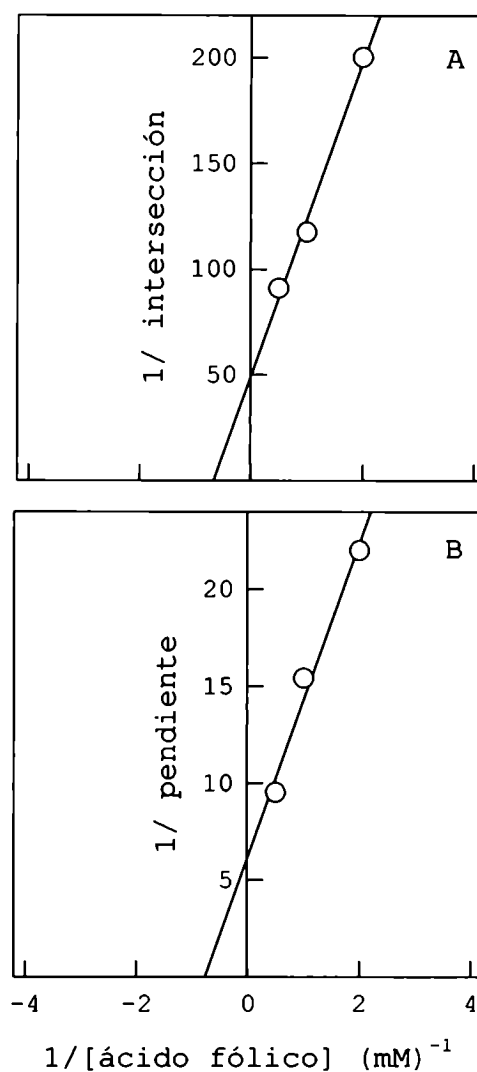


Figura R-III.19: Variación de la intersección (A) ($r: 0,995$) y la pendiente (B) ($r: 0,987$) en función de $1/[\text{ácido fólico}]$.

Los valores obtenidos son $\alpha = 1$; $\beta = 1,6$; $K_s = 12 \mu\text{M}$ y $K_A = 1,66 \text{ mM}$. El hecho de que α sea 1 indica que el efector puede unirse a la enzima libre o al intermediario ES con la misma probabilidad. Así no se modifica la afinidad de los sustratos y efectores para sintetizar los intermediarios E-Fólico-PBG o E-PBG-Fólico, pero dado que $v = k_p [\text{ES}] + \beta k_p [\text{ESA}]$ y $\beta > 1$, se produce un incremento en la velocidad de la reacción (Noriega *et al.*, 1992).

III.5 Efecto de la sulfamerazina

Se sabe que las sulfonamidas provocan ataques de porfiria aguda (Stein & Tschudy, 1970; Eales, 1971). Experiencias realizadas en nuestro laboratorio demostraron que en ratas, una inyección i.p. de sulfamerazina (SMZ) (1g/kg) producía una inhibición del 30% en la actividad de la PBG-D de eritrocitos (Kotler *et al.*, 1988a). Paralelamente, incubaciones realizadas en presencia de SMZ 3,0 mM revelaron una inhibición del 55% en la actividad de la misma enzima (Kotler *et al.*, 1988b).

En base a estos antecedentes se decidió estudiar el efecto de la SMZ sobre la cinética de la PBG-D de hígado de rata.

III.5.1 Efecto de distintas concentraciones de sulfamerazina sobre las propiedades cinéticas de la PBG-D de hígado de rata

Se realizaron incubaciones de la fracción Fs en presencia de concentraciones variables de SMZ (0 - 3 mM) y PBG saturante (66 μ M). La Figura R-II.20 indica que la máxima inhibición (25%) se alcanza a partir de una concentración de 2,0 mM de SMZ. Estos resultados nos permiten seleccionar las concentraciones óptimas del efector para realizar los estudios de velocidades iniciales y así caracterizar esta inhibición.

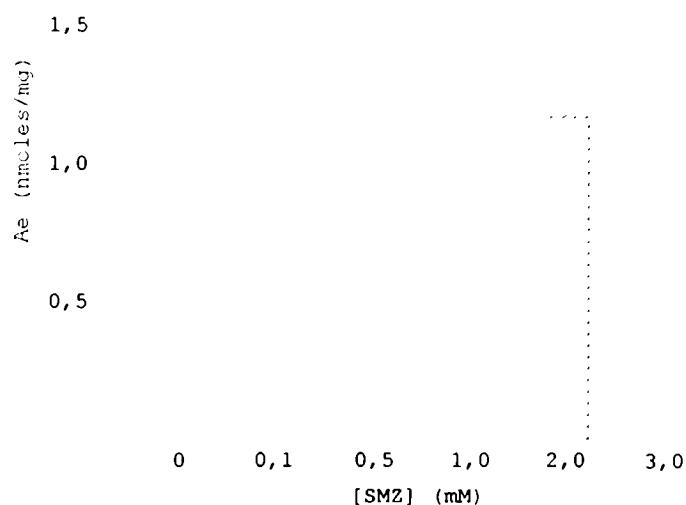


Figura R-III.20: Efecto de distintas concentraciones de SMZ sobre la actividad de la PBG-D de hígado de rata. La obtención de la fracción F_s así como la medición de la actividad se detallan en Métodos. * $p < 0,01$; ** $p < 0,005$

Empleando la fracción F_s como extracto enzimático se evaluó el efecto inhibitorio sobre la velocidad inicial de la reacción, de tres concentraciones de SMZ (0,5; 1,0 y 2,0 mM) (**Figura R-III.21**).

En base a los resultados obtenidos se observa una inhibición de tipo no competitivo dado que tanto los parámetros cinéticos V_m y K_m como el cociente K_m / V_m varían con la concentración del inhibidor (**Figura R-III.21**). Estos resultados están de acuerdo con los publicados por Peters *et al.*, (1980). Las correspondientes constantes se encuentran tabuladas en la **Tabla R-III.5**.

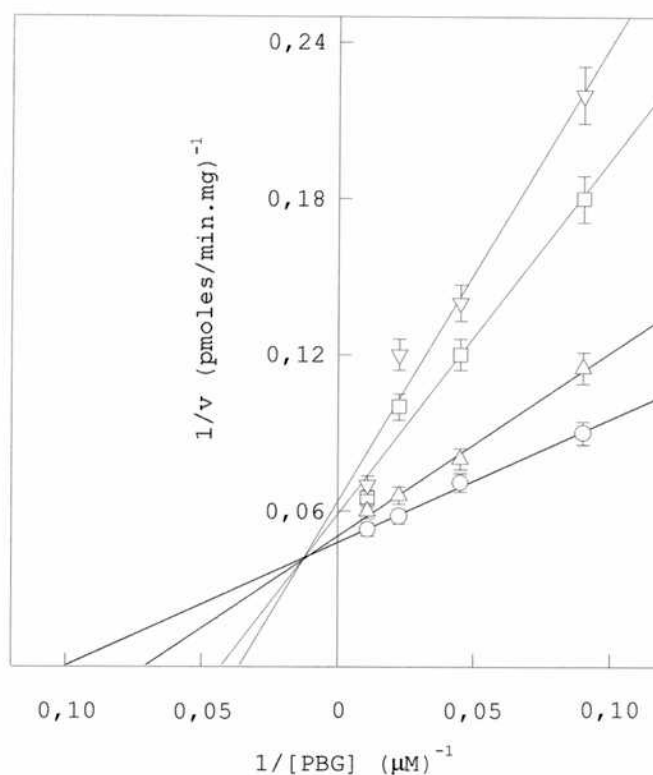


Figura R-III.21: Gráfico de Lineweaver-Burk. Se midieron velocidades iniciales y se graficaron las inversas, variando la concentración de PBG (0 - 66 μM), en ausencia (O) (r : 0,999) y en presencia de distintas concentraciones de SMZ ($\square$ 0,5 mM; ∇ 1,0 mM; Δ 2,0 mM; (r : 0,965 - 0,987).

Tabla R-III.5: Efecto de la SMZ sobre las constantes cinéticas de la PBG-D de hígado de rata

Sistema	Km (μM)	Vm (pmoles / min.mg)	Coefficiente de Hill
control	$10,0 \pm 1,2$	$20,8 \pm 1,0$	1
[SMZ] 0,5 mM	$14,3 \pm 1,7$	$19,7 \pm 1,0$	1
1,0 mM	$23,3 \pm 2,8$	$16,9 \pm 0,8$	1
2,0 mM	$28,6 \pm 3,4$	$15,6 \pm 0,8$	1

Los coeficientes n se calcularon a partir de las pendientes de los gráficos de Hill.

Regraficando las pendientes e intersecciones de la Figura R-III.21 en función de la concentración del inhibidor (Figura R-III 22 A,B) se establece que la inhibición no competitiva es de tipo lineal y se obtienen las constantes de disociación K_{ip} : 1,37 mM y K_{ii} : 2,59 mM, donde K_{ip} y K_{ii} representan las constantes de inhibición que afectan la pendiente e intersección respectivamente.

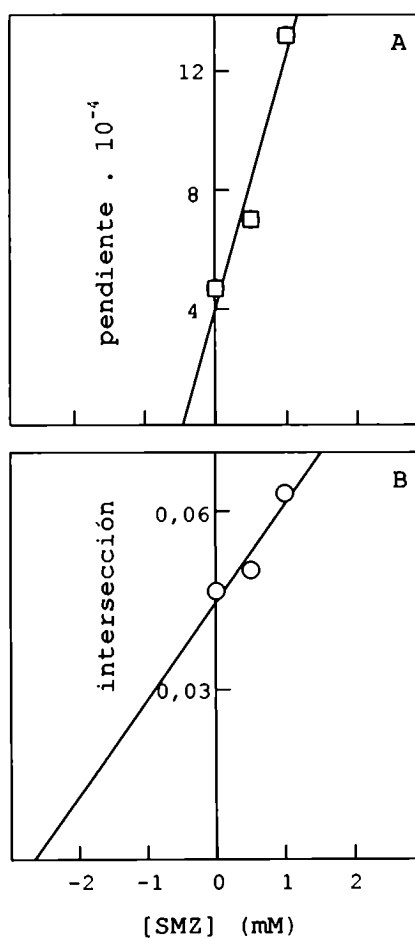


Figura R-III.22: Variación de la pendiente (A) (r : 0,967) y de la intersección (B) (r : 0,948) calculadas del gráfico de dobles recíprocas (Figura R-III.21), en función del inhibidor.

CAPITULO IV

PBG-Deaminasa de riñón de rata Estudios cinéticos

	Página
IV.1. Estudios de velocidades iniciales.....	160
IV.2. Cinética de la PBG-D de riñón de rata en fracciones enzimáticas con distinto grado de purificación.....	167
IV.3. Discriminación de modelos. Error residual.....	174
IV.3.1 Activación por sustrato.....	177
IV.3.2 Existencia de isoformas: Cinética de la PBG-D de corteza y médula de riñón de rata.....	178

IV. PBG-DEAMINASA DE RIÑÓN DE RATA

ESTUDIOS CINÉTICOS

El objetivo de este capítulo consiste en determinar los parámetros cinéticos de la PBG-D de riñón de rata mediante estudios de velocidades iniciales y elucidar la cinética de la reacción.

IV.1. Estudios de velocidades iniciales

En experiencias previas, se había observado que la curva de saturación por sustrato correspondiente a la PBG-D de riñón de rata presentaba un perfil hiperbólico. Continuando con el análisis de las propiedades de esta enzima, se resolvió estudiar la cinética de la misma. La Figura R-IV.1 muestra los típicos gráficos de formación de uroporfirina I en función del tiempo de incubación (0 - 60 min.), para tres concentraciones de sustrato (4, 12 y 60 μM).

Se observa que la formación de porfirinas es lineal sólo a tiempos cortos, 20 y 30 min., para 4 y 12 μM de PBG respectivamente. Para 60 μM la linealidad se mantiene durante todo el período de incubación empleado.

A partir de los gráficos de producto formado vs tiempo, en incubaciones hasta 20 min., se calcularon las velocidades iniciales, que se graficaron en función de la concentración de sustrato (Figura R-I.3B). Sin embargo, a pesar de haber obtenido una respuesta de tipo hiperbólico, la linealización de Lineweaver-Burk mostró una curva cóncava hacia abajo (Figura R-IV.2).

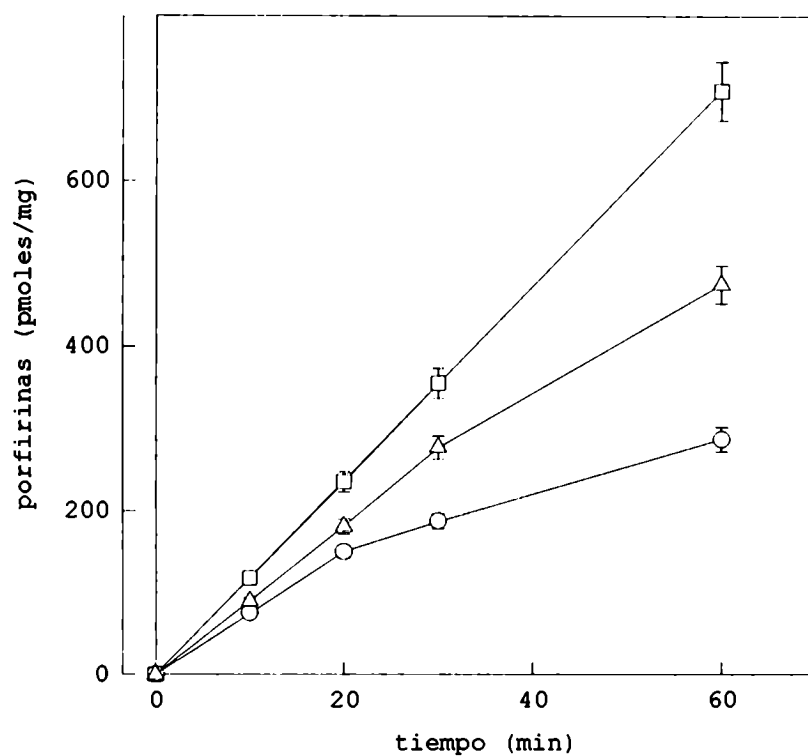


Figura R-IV.1: Porphirinas formadas vs tiempo de incubación. Se midió la formación de producto en función del tiempo a partir de distintas concentraciones de sustrato: O 4 μM ; Δ 12 μM y $\square$ 60 μM (r : 0,999). La obtención de la fracción enzimática F_s y el sistema de incubación se detallan en Métodos.

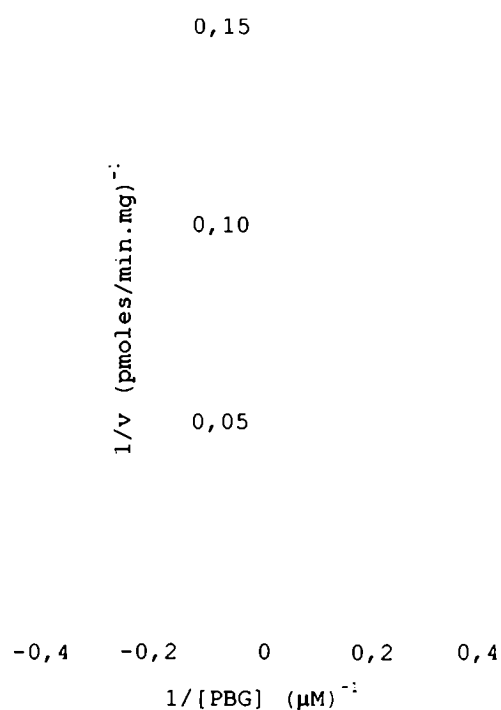


Figura R-IV.2: Gráfico de Lineweaver-Burk para la PBG-D de riñón de rata. Las inversas se calcularon a partir del gráfico de la **Figura R-I.3 B**.

Para confirmar este comportamiento no lineal en los gráficos de Lineweaver-Burk, se determinaron nuevamente velocidades iniciales. Esta vez se incluyeron más concentraciones de PBG correspondientes a la zona de orden mixto de reacción. Además, dada la posibilidad de encontrarnos frente a una cooperatividad negativa, se decidió aumentar también los puntos correspondientes a bajas concentraciones de PBG. La **Figura R-IV.3** muestra la curva de sustrato que se obtiene cuando la concentración de PBG varía entre 0,8 y 66 μ M.

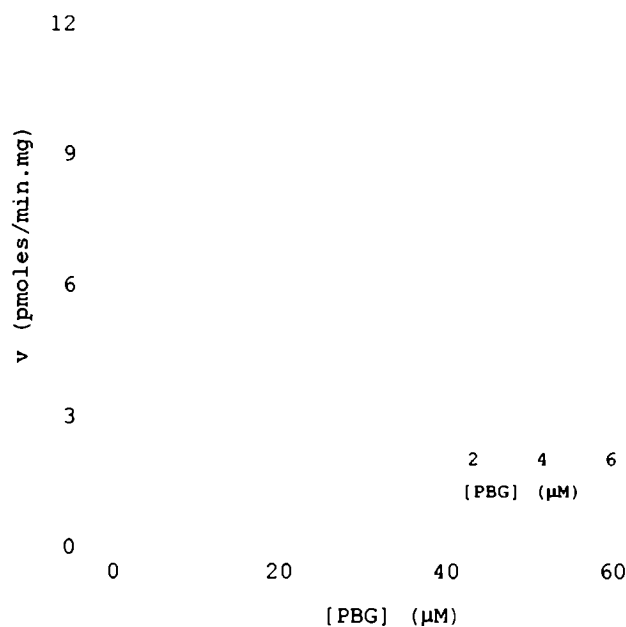


Figura R-IV.3: Velocidad inicial en función de la concentración de PBG para la PBG-D de riñón de rata. La obtención de la fracción enzimática Fs y las condiciones experimentales se detallan en Métodos.

La curva de saturación presenta a primera vista, un aspecto hiperbólico. Sin embargo, cuando se grafican las velocidades iniciales en función de la concentración de PBG comprendida entre 0,8 y 7,0 μM , se observa que se alcanza una primera zona de saturación entre 5,0 y 7,0 μM (Figura R-IV.3-Inset), ya levemente percibida en el gráfico total, y luego la velocidad aumenta nuevamente.

El gráfico de dobles recíprocas (Figura R-IV.4) no es lineal y muestra un carácter bimodal que se traduce en dos constantes aparentes de afinidad (K_{m1} y K_{m2}). Por otra parte no se observa inhibición por sustrato aún cuando la mayor concentración de PBG empleada (66 μM) es 19 veces mayor que el K_{m2} calculado ($3,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$).

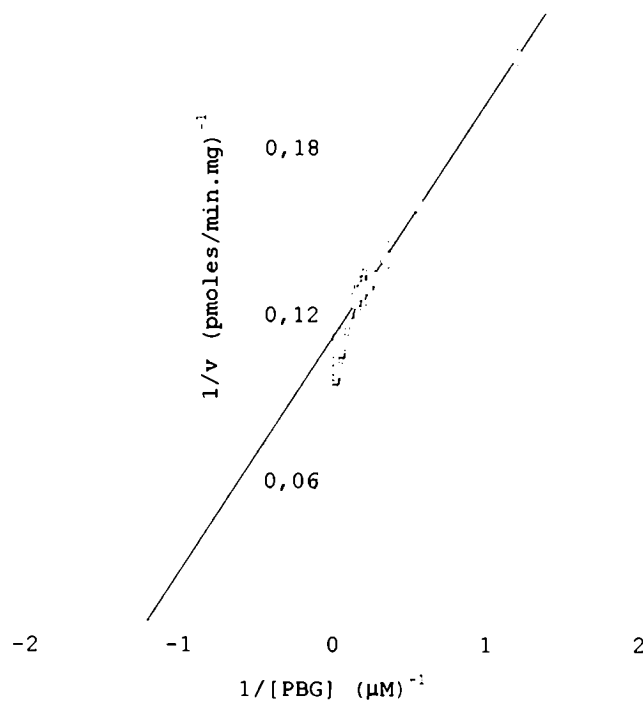


Figura R-IV.4: Linealización de Lineweaver-Burk correspondiente a los datos de la **Figura R-IV.3** ([PBG]: 0 - 7 μM , r : 0,998; [PBG]: 7 - 66 μM , r : 0,984).

Con el objeto de confirmar este comportamiento se realizaron los gráficos de Eadie, donde se representa el cociente velocidad inicial / [sustrato] en función de la velocidad inicial. Esta representación es lineal para una cinética michaeliana pero presenta forma de campana cuando existen efectos homotrópicos cooperativos (Hensley *et al.*, 1981). Más aún, los gráficos de Eadie son muy sensibles para detectar efectos homotrópicos en enzimas que presentan baja cooperatividad. La **Figura R-IV.5** muestra para la PBG-D de riñón de rata, una desviación de la linealidad, indicando nuevamente un comportamiento no michaeliano con presencia de dos pendientes.

Las constantes cinéticas aparentes determinadas a pH 8,2 a partir de los gráficos de Lineweaver-Burk y de Eadie se presentan en la **Tabla R-IV.1**. Se observa que los K_m 's son menores que los hallados para la enzima hepática ($12,0 \pm 1,4 \mu\text{M}$), pero del mismo orden que los obtenidos en eritrocitos humanos ($6 \mu\text{M}$ a pH 8,2; Anderson &

Desnick, 1980), bazo de rata ($1 \mu\text{M}$ a pH 7,5; Williams, 1984), linfoblastos humanos ($8 \mu\text{M}$ a pH 8,2; Meissner *et al.*, 1993) y glándula de Harder de rata ($3 \mu\text{M}$ a pH 7,4; Cardalda *et al.*, 1997).

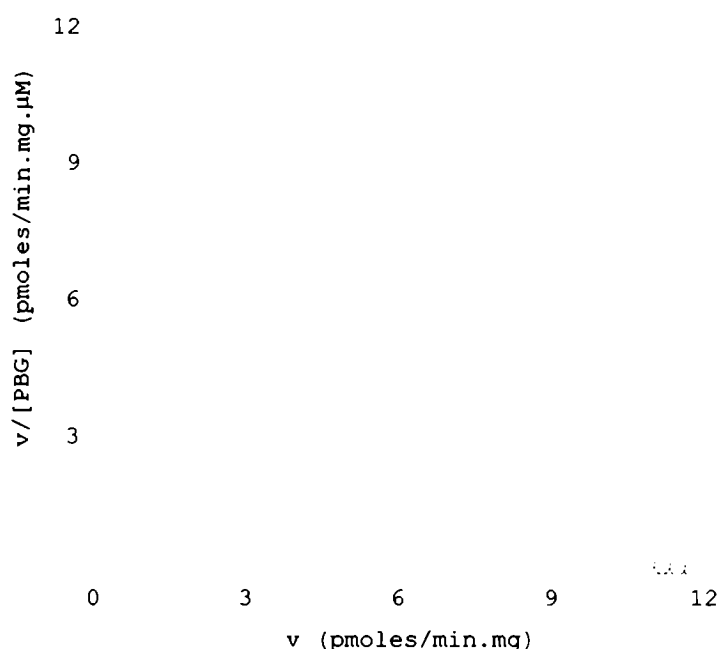


Figura R-IV.5: Linealización de Eadie. Las condiciones experimentales son las detalladas en la **Figura R-IV.3** (v: 0 - 8 pmoles/min.mg, r: 0,942; v: 8 - 12 pmoles/min.mg, r: 0,965)

Estos resultados son muy llamativos dado que en la mayoría de las fuentes estudiadas la PBG-D presenta una cinética michaeliana. Sin embargo, se debe resaltar que en muchos de estos trabajos el rango de concentraciones de PBG empleado no ha sido tan amplio como el examinado en el presente estudio. Por esta razón pudo no haberse detectado la presencia de dos pendientes en el gráfico de dobles inversas.

Tabla R-IV.1: Constantes cinéticas de la PBG-D de riñón de rata a bajas y altas concentraciones de sustrato

Gráfico	[PBG] (μM)	K _m (μM)	V _m (pmoles/min.mg)	Coefficiente de Hill
Lineweaver -	0,8 - 7	$0,8 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,7$	1
Burk	7 - 66	$3,5 \pm 0,4$	$11,6 \pm 0,9$	1
Eadie	0,8 - 7	$0,7 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,7$	1
	7 - 66	$3,4 \pm 0,4$	$11,2 \pm 0,9$	1

Las constantes tabuladas se calcularon a partir de los gráficos de las Figuras R-IV.4 - 5.

Ya se ha mencionado en el capítulo anterior (ítem R-III.2.) que reacciones que involucran cuatro moléculas de sustrato poseen expresiones complejas de velocidad inicial y gráficos de dobles recíprocas no lineales (Elliot & Tipton, 1974), apareciendo esta no linealidad cuando el sustrato se une a formas enzimáticas conectadas reversiblemente (Cleland, 1963). Bajo condiciones de velocidades iniciales, se considera a la concentración de producto como cero y a la liberación del mismo de la enzima como un paso irreversible durante la reacción. Sin embargo, la reversibilidad en el camino de reacción se podría presentar si, como para el caso de la PBG-D de riñón, el amonio permaneciera unido a la proteína hasta la formación final del hidroximetilbilano.

En estudios previos realizados por Llambias & Batlle (1970a;b) en callos de soja ya se había observado un comportamiento cinético no michaeliano para esta enzima. A bajas concentraciones de sustrato se obtuvo una curva hiperbólica que presentaba una zona de saturación desde 30 a 100 μM . Al aumentar la concentración del sustrato aparecía una segunda curva que no se saturaba, aún a la máxima concentración de PBG utilizada (200 μM). Los gráficos de inversas eran no lineales y mostraban un comportamiento bimodal. Posteriormente Fumagalli *et al.* (1984) demostraron que la

PBG-D de eritrocitos humanos presentaba efectos homotrópicos positivos, mostrando dos sitios tanto para la unión del PBG como para la liberación del producto.

IV.2. Cinética de la PBG-D de riñón de rata en fracciones enzimáticas con distinto grado de purificación

Cuando se estudió el comportamiento cinético de la PBG-D en sonicados de linfoblastos provenientes de pacientes con porfiria variegata (Meissner *et al.*, 1993), se encontró que en la fracción cruda la velocidad tenía una dependencia sigmoidea con la concentración de sustrato y los datos no se ajustaban a la ecuación de Michaelis Menten. Sin embargo, cuando los mismos estudios se llevaron a cabo utilizando una fracción parcialmente purificada, de la cual se habían extraído los porfirinógenos y las porfirinas endógenas, esta enzima presentó un comportamiento michaeliano.

A pesar de que nuestro extracto crudo no posee porfirinas endógenas, pero dado que los resultados cinéticos hasta aquí presentados fueron obtenidos con la fracción F₃ de riñón, resultó de interés realizar el estudio de velocidades iniciales empleando fracciones de PBG-D de mayor grado de purificación.

La Figura R-IV.6 nos muestra el gráfico de dobles recíprocas para la fracción proveniente de un tamiz molecular (Sephadex G-100), purificada 190 veces respecto al homogenato. Las constantes cinéticas calculadas a partir de dichas inversas se encuentran en la Tabla R-IV.2. El análisis de los datos nos permite concluir que en esta fracción la PBG-D conserva el comportamiento anteriormente observado. El cambio de pendiente en el gráfico de Lineweaver-Burk tiene lugar a la misma concentración de PBG (7 μ M) pero los valores de K_m son mayores.

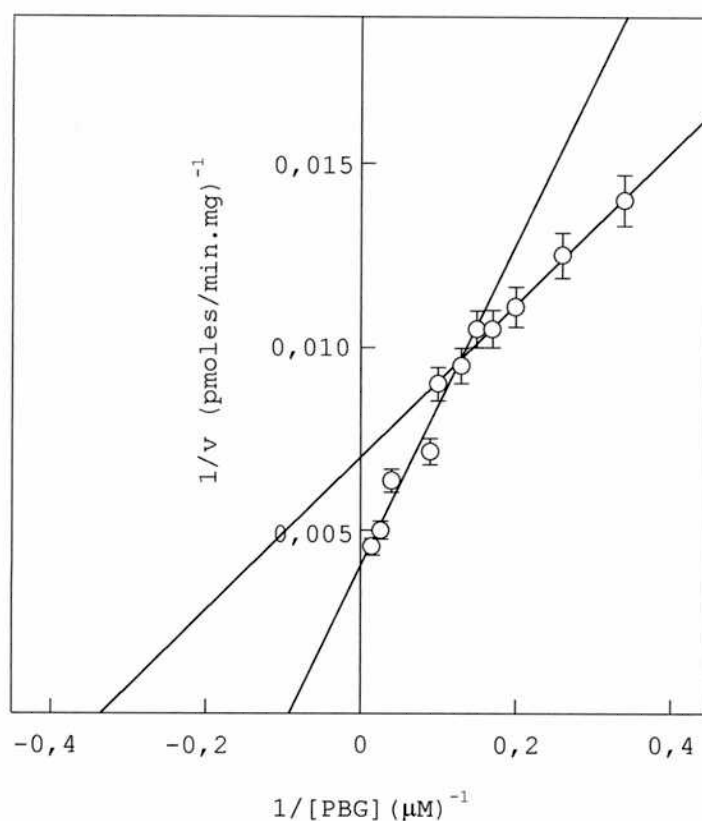


Figura R-IV.6: Gráfico de Lineweaver-Burk para la fracción proveniente del Sephadex G-100. La obtención de la misma y las condiciones experimentales para la determinación de velocidades iniciales se detallan en Métodos; ([PBG]: 0 - 7 μM , r : 0,993; [PBG]: 7 - 66 μM , r : 0,943).

Tabla R-IV.2: Constantes cinéticas de la PBG-D de riñón de rata determinadas empleando la fracción G-100

[PBG] (μM)	K _m (μM)	V _m (pmoles /min.mg)	Coefficiente de Hill
0 - 7	$3,1 \pm 0,4$	$142,8 \pm 5,1$	1
7 - 66	$12,5 \pm 1,5$	$247,5 \pm 7,4$	1

Los datos se calcularon a partir de los gráficos de la [Figura R-IV.6](#). Los coeficientes n se obtuvieron de las pendientes de los gráficos de Hill.

La siguiente fracción empleada fue la proveniente de la Q-Sepharosa. Dado que la elución de la PBG-D de este intercambiador aniónico se realiza con NaCl 0,5 - 0,6 M, la cinética fue estudiada en presencia (Figura R-IV.7) y en ausencia de sodio (Figura R-IV.8).

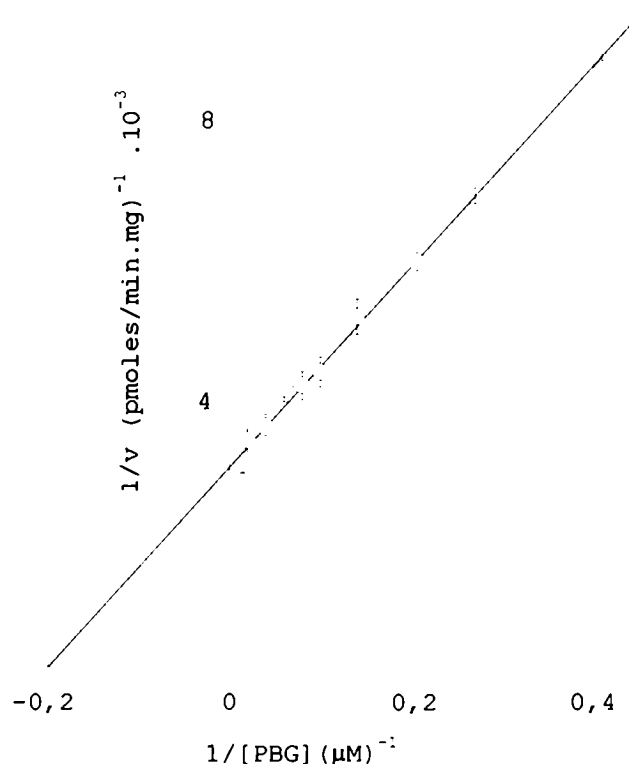


Figura R-IV.7: Gráfico de Lineweaver-Burk para la PBG-D de riñón. La obtención de la fracción proveniente de la Q-Sepharosa y las condiciones experimentales para la determinación de las velocidades iniciales se detallan en Métodos. Las velocidades iniciales se midieron en el eluido de la Q-Sepharosa sin dializar; (r: 0,993).

En presencia de NaCl 0,5-0,6 M se obtiene una sola pendiente que se traduce en un único K_m ($5,0 \pm 0,6 \mu M$) y en una única V_m ($331,3 \pm 16,6$ pmoles/min.mg). En cambio, cuando el eluido de la Q-Sepharosa es desalado mediante diálisis, se observan nuevamente las dos pendientes (Figura R-IV.8; Tabla R-IV.3).

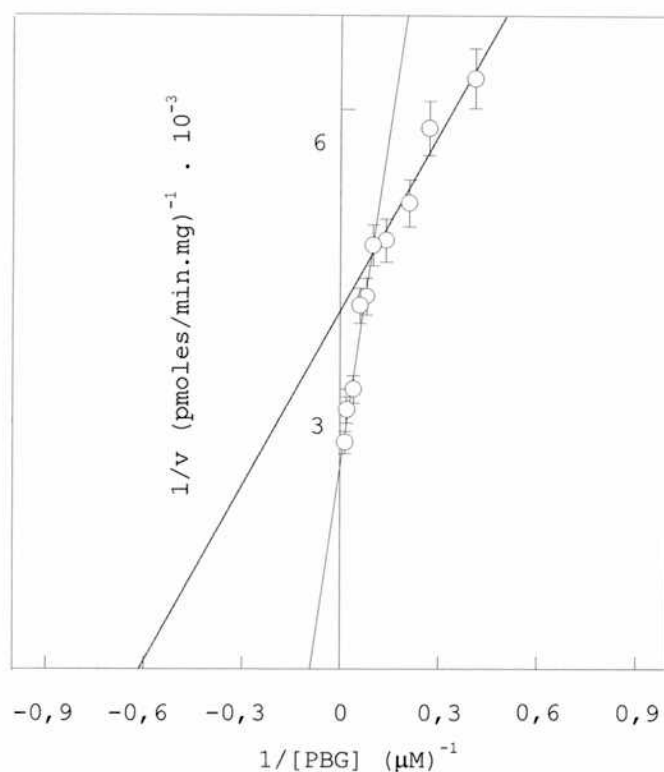


Figura R-IV.8: Gráfico de inversas de la PBG-D de riñón de rata. Se utilizó la fracción dializada del eluido de la Q-Sepharosa. El sistema de incubación y los demás detalles experimentales se encuentran en Métodos; ([PBG]: 0 - 7 μM , r : 0,975; [PBG]: 7 - 66 μM , r : 0,975).

Tabla R-IV.3: Constantes cinéticas de la PBG-D de riñón de rata calculadas en el eluido dializado de la Q-Sepharosa

[PBG] (μM)	K_m (μM)	V_m (pmoles/min.mg)	Coefficiente de Hill
0-7	$1,5 \pm 0,2$	260 ± 8	1
7-66	$11,0 \pm 1,3$	459 ± 13	1

Los datos tabulados se calcularon a partir de la **Figura R-IV.8**.

Para confirmar este comportamiento, se preincubó la fracción dializada proveniente de la Q-Sepharosa en presencia de NaCl 0,5 M a 4°C durante 30 minutos y se efectuaron los estudios de velocidades iniciales. La Figura R-IV.9 muestra que la cinética de la reacción se ajusta a un modelo michaeliano. La linealización de Lineweaver-Burk permite calcular un único valor de K_m ($5,2 \pm 0,6 \mu\text{M}$), que es coincidente con el obtenido con la fracción sin desalar, y una única V_m (384 ± 19 pmoles/min.mg).

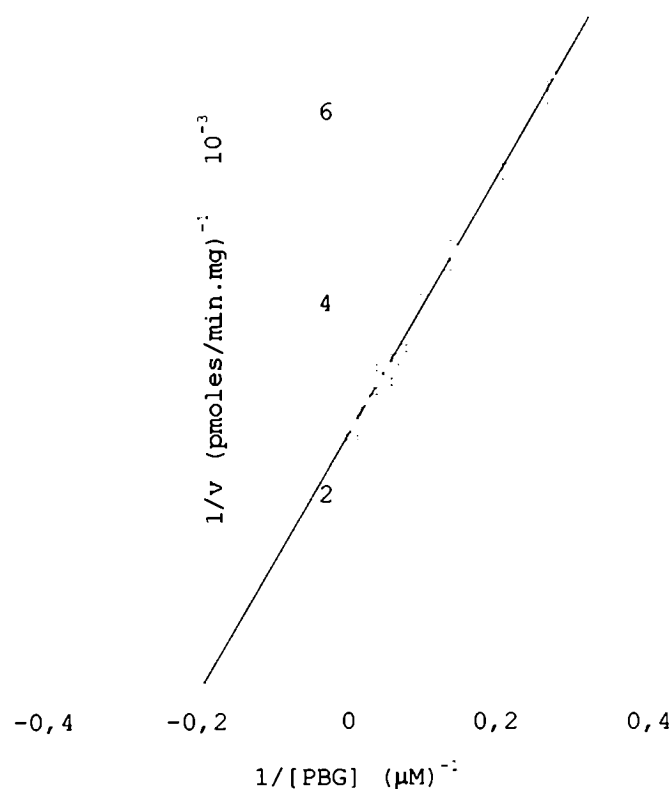


Figura R-IV.9: Gráfico de Lineweaver-Burk de la PBG-D de riñón de rata. Se utilizó la fracción dializada de la Q-Sepharosa preincubada con NaCl 0,5 M ($r: 0,993$).

La siguiente fracción ensayada fue la proveniente de la Blue-Sepharosa, purificada 700 veces respecto al homogenato inicial. Dado que la PBG-D se eluye de esta columna también con NaCl, pero a una concentración mayor, se efectuaron los estudios de velocidades iniciales en presencia (Figura R-IV.10) y ausencia del mismo (Figura R-IV.11; Tabla R-IV.4)

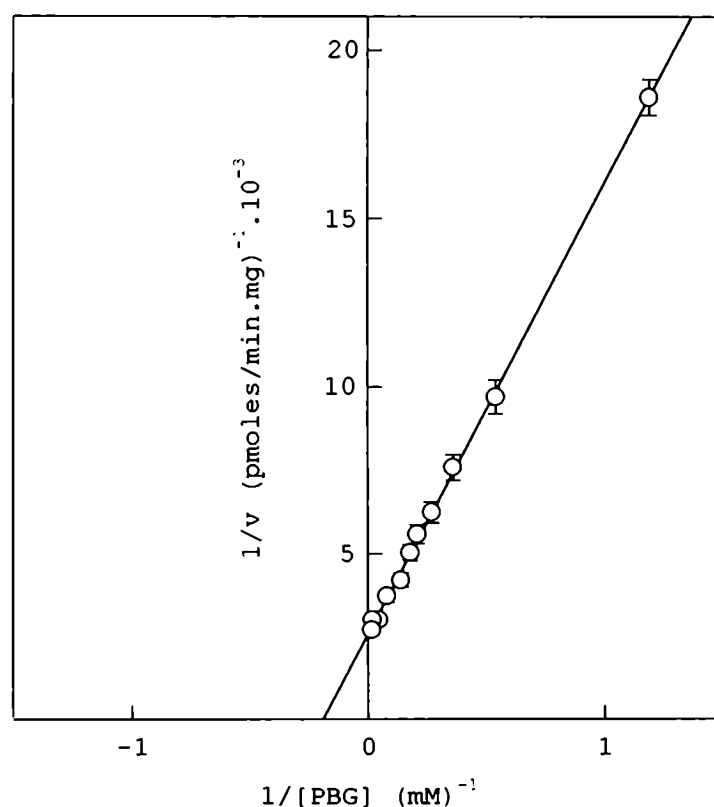


Figura R-IV.10: Gráfico de Lineweaver-Burk para la PBG-D de riñón. La obtención de la fracción proveniente de la Blue-Sepharosa y las condiciones experimentales para la determinación de las velocidades iniciales se detallan en Métodos. Las velocidades iniciales se midieron en el eluido de la Blue-Sepharosa sin dializar; (r: 0,999).

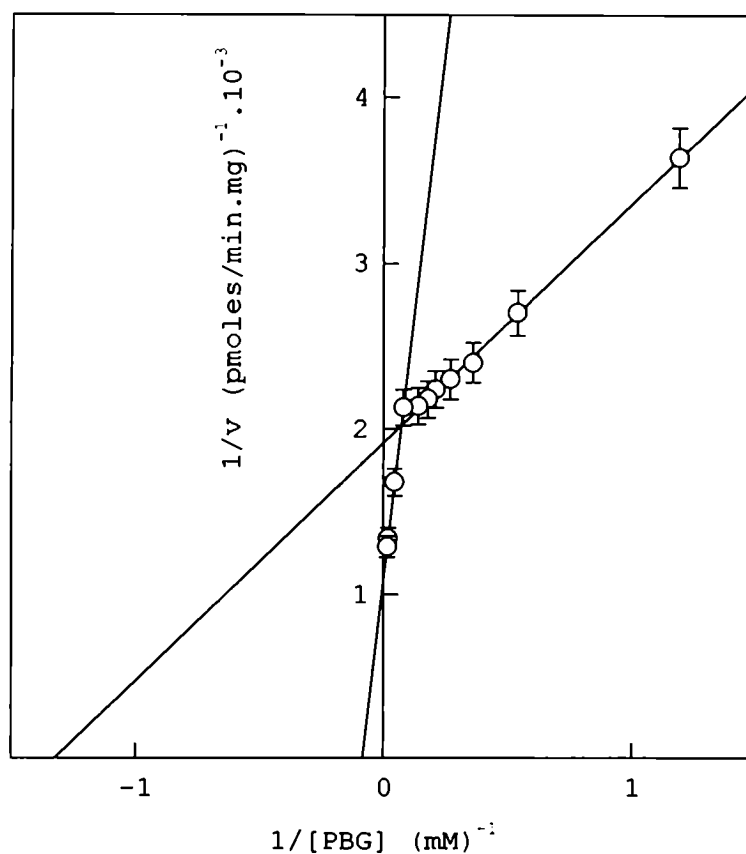


Figura R.IV.11: Gráfico de inversas de la PBG-D de riñón de rata. Se utilizó la fracción dializada del eluido de la Blue-Sepharosa. El sistema de incubación y los demás detalles experimentales se encuentran en Métodos; ([PBG]: 0 - 7 μM , r : 0,999; [PBG]: 7 - 66 μM , r : 0,999).

Nuevamente se obtuvo el mismo comportamiento cinético que con la fracción anterior; en presencia de NaCl 1,1 M se obtuvo una sola pendiente con un K_m de $5,0 \pm 0,6 \mu\text{M}$ y una V_m de $377 \pm 19 \text{ pmol/min.mg}$, mientras que la fracción desalada por diálisis mostró dos pendientes, cuyas constantes se encuentran en la [Tabla R-IV.4](#).

Tabla R-IV.4: Constantes cinéticas de la PBG-D de riñón de rata calculadas en el eluido dializado de la Blue-Sepharosa

[PBG] (μM)	Km (μM)	Vm (pmoles/min.mg)	Coefficiente de Hill
0,8 - 7	$0,75 \pm 0,09$	521 ± 13	1
7 - 66	$3,6 \pm 0,4$	913 ± 15	1

Los datos tabulados se calcularon a partir de la Figura R-IV.11.

IV.3. Discriminación de modelos. Error residual

La mayoría de las experiencias que se efectúan en estudios cinéticos bioquímicos se analiza a través de métodos gráficos. El ajuste de los datos experimentales a curvas o rectas se realiza actualmente por el software de programas tipo Excel o Sigma-Plot o algunos más específicos para estudios cinéticos como el Leonora (Cornish-Bowden, 1995). Para corroborar si el ajuste efectuado por dichos programas es el correcto, se utilizan gráficos denominados de **error residual**, que permiten observar fácilmente si existen desviaciones o no, respecto al modelo elegido (Cárdenas & Cornish-Bowden, 1993; Cornish-Bowden, 1995). Para tal fin y en nuestro caso considerando los datos de velocidades iniciales, se grafica la diferencia entre la v experimental (v_{exp}) y la calculada (v_t) vs una variable independiente, como por ejemplo la concentración de sustrato, o una variable calculada, como la velocidad inicial teórica v_t . Estos gráficos permiten diferenciar errores de distinto tipo: random, experimentales, sistemáticos, de redondeo excesivo o por pobre diseño experimental. La presencia de errores sistemáticos indica que el ajuste se ha realizado a un modelo incorrecto, mientras que la aparición de errores de tipo random muestra que el ajuste es el adecuado (Cornish-Bowden, 1995). Por otro lado, debe tenerse en cuenta que estos errores pueden presentarse en forma conjunta, lo cual puede complicar el análisis de los mismos.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se realizaron los gráficos $(v_{\text{exp}} - v_i)$ vs [PBG] y vs v_i para los dos rangos de concentraciones estudiados: 0 - 7 μM y 7 - 66 μM . Se observó una dispersión de tipo random, la que fue también confirmada graficando $([\text{PBG}] / v_i - [\text{PBG}] / v_{\text{exp}})$ vs [PBG] o vs v_i . Las Figuras R-IV.12-13 muestran resultados típicos de la distribución random obtenida. Según estos resultados el ajuste de las rectas de los gráficos de Lineweaver-Burk y de Eadie a los datos experimentales es el adecuado.

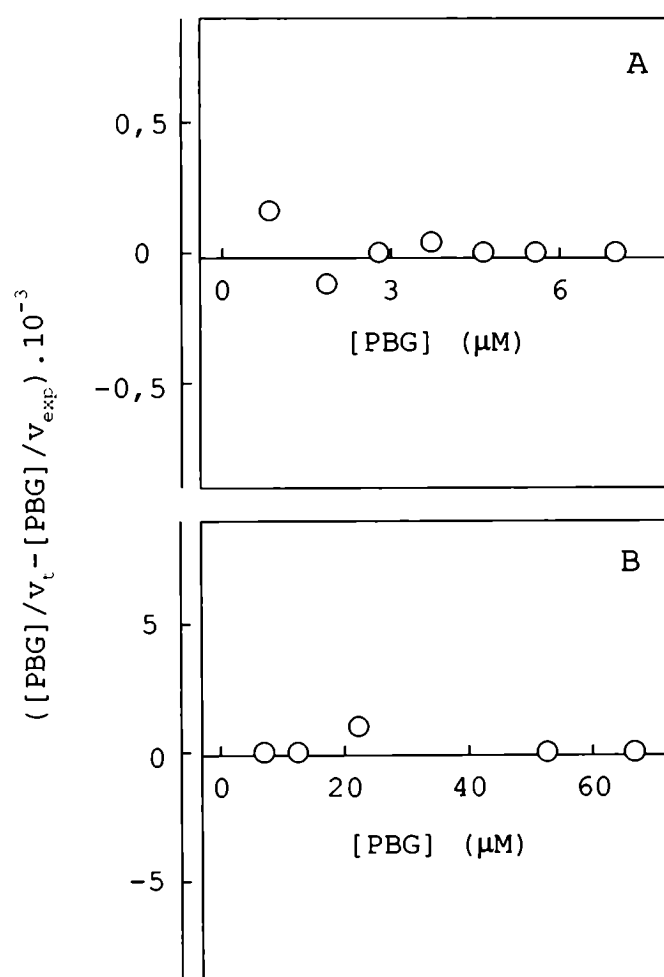


Figura R-IV.12: Gráfico de error residual para bajas (A) y altas (B) concentraciones de PBG. Los datos graficados corresponden a los de la Figura R-IV.3.

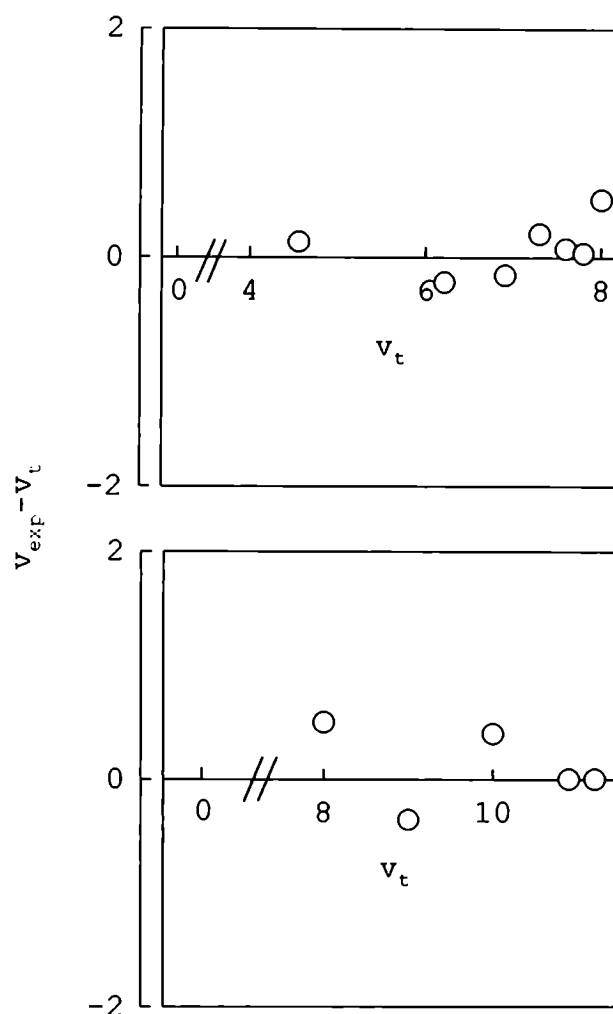


Figura R-IV.13: Gráfico de error residual para bajas (A) y altas (B) concentraciones de PBG. Los datos graficados corresponden a los de la Figura R-IV.3.

La no linealidad que muestran los gráficos de Lineweaver-Burk (Figura R-IV.2 y 4) y de Eadie (Figura R-IV.5) puede presentarse en los siguientes mecanismos: activación por sustrato, existencia de dos sitios activos independientes con diferentes constantes cinéticas, cooperatividad negativa o presencia de distintas isoformas.

IV. 3.1 Activación por sustrato

El sustrato puede afectar la actividad enzimática por unión a un sitio distinto del catalítico, actuando como efector. Frieden (1964) ha estudiado el efecto de modificadores en la cinética de enzimas que poseen un solo sustrato. Dentro de las distintas situaciones planteadas este autor, se encuentra la **activación por sustrato**.

Se decidió analizar si los datos de la Figura R-IV.3 se ajustan a la ecuación planteada por Frieden (1959) para esta situación, la cual se aplica a enzimas de un solo sustrato, que tienen al menos dos sitios de unión, uno catalítico y otro activante, con distintas afinidades. La ecuación correspondiente establece que:

$$v = \frac{V_{m1} + V_{m2} \frac{[PBG]}{K_{m2}}}{1 + \frac{K_{m1}}{[PBG]} + \frac{K_{m2}}{[PBG]}}$$

donde K_{m1} y K_{m2} son las constantes de Michaelis correspondientes a los sitios de unión con mayor y menor afinidad para el PBG respectivamente; V_{m1} es la velocidad máxima cuando se satura el primer sitio y V_{m2} es la velocidad máxima que se alcanza cuando ambos sitios están ocupados.

El ajuste a la ecuación de Frieden (Figura R-IV.14) muestra que la curva teórica obtenida no coincide con la experimental y que las mismas no presentan el mismo comportamiento cinético. Este resultado permite descartar la presencia de un mecanismo de activación por sustrato en la PBG-D renal.

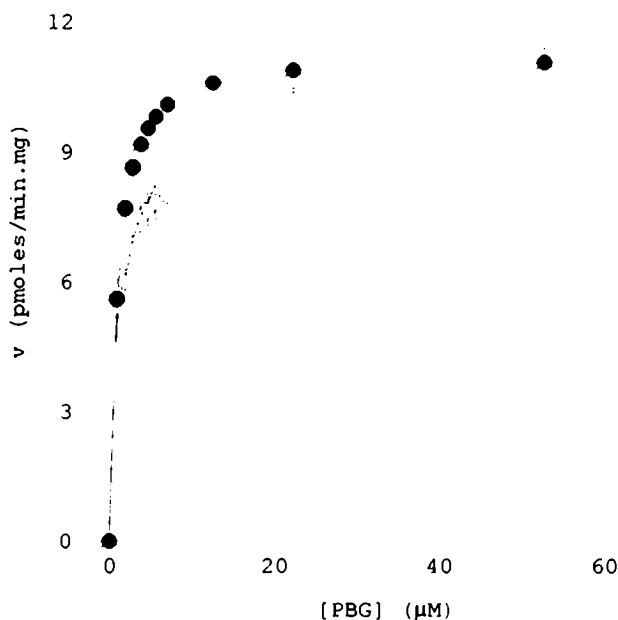


Figura R-IV.14: Curva experimental (O) correspondiente a los datos de la [Figura R-IV.3](#) y curva teórica (□) derivada de la ecuación de Frieden a partir de los datos de la [Figura R-IV.4](#).

IV. 3.2 Existencia de isoformas. Cinética de la PBG-Deaminasa de corteza y médula de riñón de rata

La presencia de isoenzimas de la PBG-D fue publicada por primera vez en 1979, por Miyagi *et al.*, quienes aplicando cromatografía en DEAE-Sephadex y electroforesis en geles de poliacrilamida lograron detectar tres bandas proteicas activas en eritrocitos humanos. En investigaciones posteriores, se ha logrado aislar intermediarios enzima-sustrato tanto en eritrocitos humanos (Anderson & Desnick, 1980) como en bazo de rata (Williams, 1984), los cuales hasta el momento no han sido relacionados de ninguna forma con las isoenzimas de Miyagi. Estudios más recientes permitieron aislar dichos intermediarios mediante fplc en una cepa recombinante de *E. coli* (Jordan *et al.*, 1988).

Dado que el riñón está constituido por tres estructuras distintas, con diferentes características anatómicas, funcionales y metabólicas, existe la posibilidad que el riñón presente isoformas de la enzima, que podrían encontrarse compartimentalizadas o juntas pero en distinta proporción. Se decidió entonces, realizar estudios de velocidades iniciales en las fracciones F_s obtenidas de corteza y médula.

La Figura R-IV.15 A-B muestra los gráficos de Lineweaver-Burk para corteza y médula respectivamente.

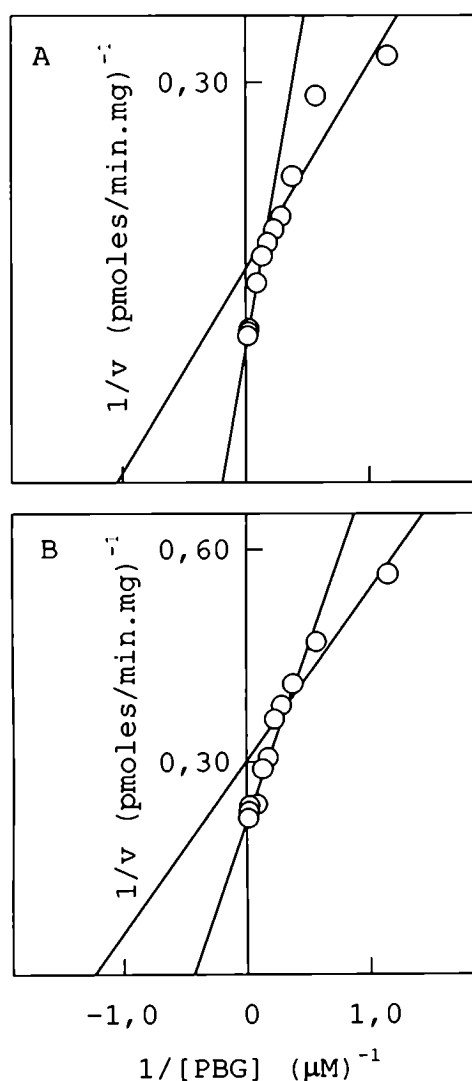


Figura R-IV.15: Gráfico de Lineweaver-Burk para la PBG-D de corteza (A) y médula (B) de riñón de rata. La obtención de la fracción F_s y las condiciones experimentales para la determinación de velocidades iniciales están detalladas en Métodos (A: [PBG]: 0 - 7 μM , r: 0,937; [PBG]: 7 - 66 μM , r: 0,997; B: [PBG]: 0 - 7 μM , r: 0,963; [PBG]: 7 - 66 μM , r: 0,954).

La forma de las curvas y las pendientes correspondientes indican nuevamente un comportamiento semejante al hallado cuando se trabajó con el riñón completo. Las constantes cinéticas que se calcularon a partir de estos gráficos se presentan en la Tabla R-IV.5.

Tabla R-IV.5: Constantes cinéticas de la PBG-D de corteza y médula de riñón a bajas y altas concentraciones de sustrato

Tejido	[PBG] (μM)	Km (μM)	Vm (pmoles/min.mg)	Coeficiente de Hill
corteza	0,8 - 7	$0,9 \pm 0,1$	$6,2 \pm 0,5$	1
	7 - 66	$5,1 \pm 0,6$	$10,4 \pm 0,8$	1
médula	0,8 - 7	$0,8 \pm 0,1$	$5,9 \pm 0,5$	1
	7 - 66	$3,3 \pm 0,4$	$8,7 \pm 0,7$	1

Los datos tabulados se calcularon a partir de los gráficos de la Figura R-IV.15. Los coeficientes de Hill (n) se obtuvieron de las pendientes de los gráficos $\log(v/V_m - v)$ versus $\log [S]$.

El análisis de los gráficos de error residual nos permite concluir que tanto para la corteza (Figura R-IV.16) como para la médula (Figura R-IV.17) el ajuste realizado es el correcto.

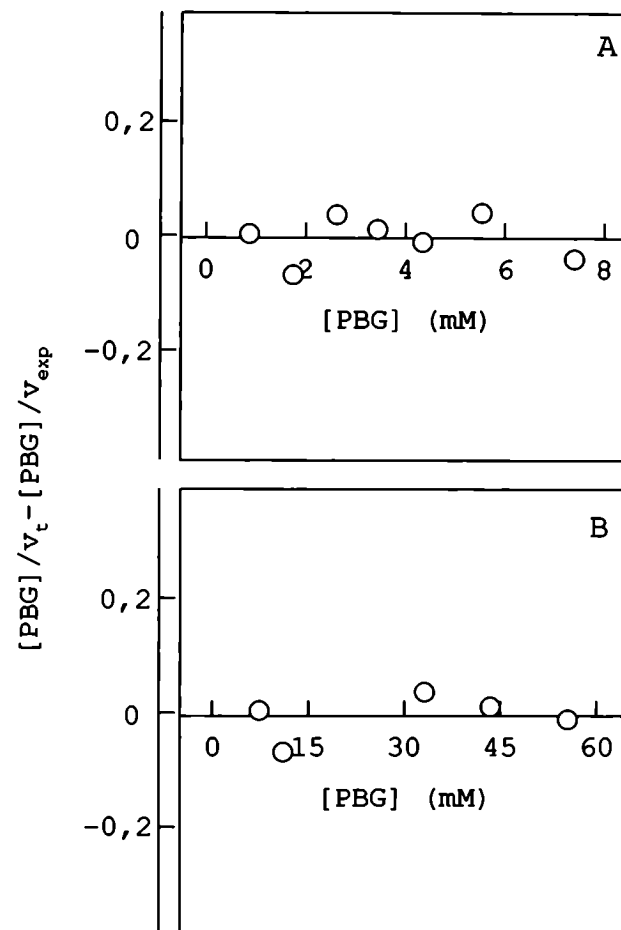


Figura R-IV.16: Gráfico de error residual para bajas (A) y altas (B) concentraciones de PBG correspondiente a la PBG-D de corteza de riñón de rata. Los datos graficados corresponden a los de la Figura R-IV.15A.

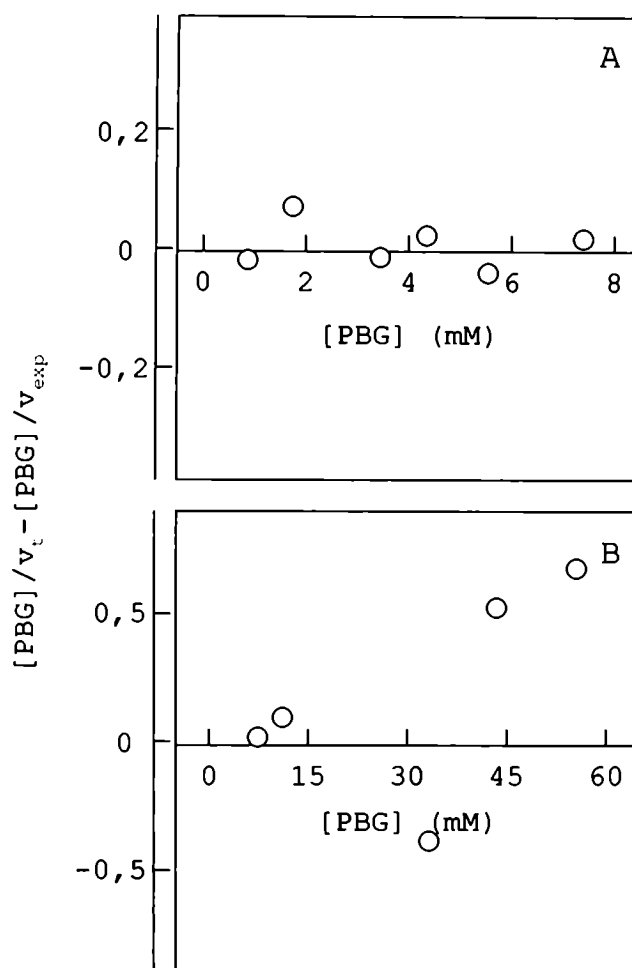


Figura R-IV.17: Gráfico de error residual para bajas (A) y altas (B) concentraciones de PBG correspondiente a la PBG-D de corteza de riñón de rata. Los datos graficados corresponden a los de la Figura R-IV.15B.

Comparando las constantes cinéticas obtenidas para el riñón completo con las correspondientes para médula y corteza, los resultados sugieren que no existirían dos poblaciones proteicas distintas cada una confinada en un tejido diferente. Sin embargo, estos datos no permiten descartar la existencia de isoformas en el órgano completo.

CAPITULO V

Electroforesis

	Página
V.1. Medición de la actividad enzimática en geles de poliacrilamida.....	183
V.2. Electroforesis preparativa.....	184
V.3. Western blot	186
V.4. Isoelectroenfoque.....	188

V. ELECTROFORESIS

Dado que uno de los objetivos del presente trabajo es la purificación a homogeneidad de la PBG-D de riñón de rata y dado que debemos discernir si estamos en presencia o no de isoformas, se resolvió emplear la técnica de electroforesis, en condiciones disociantes y nativas, para determinar no sólo la cantidad de bandas proteicas aún presentes, sino también medir actividad en los geles.

V.1. Medición de la actividad enzimática en geles de poliacrilamida

Siguiendo la metodología ya descrita (ítem M-II.5), se realizaron corridas electroforéticas en geles nativos de poliacrilamida (7,5 y 12%) utilizando el eluido proveniente de la columna de Blue-Sepharosa. Una de las calles se tiñó con Coomassie Brilliant Blue para ubicar las bandas proteicas y la otra se cortó en trozos de 3mm de ancho. Estas porciones de gel se incubaron con PBG, empleando el sistema standard de incubación (ítem M-II.3) pero a 60°C durante 90 minutos. La zona del gel que presentó actividad se relacionó con la banda proteica de igual movilidad revelada con el colorante. En la Figura R-V.1 se señala la ubicación de la banda correspondiente a la PBG-D en geles de 7,5% (corrida 1) y 12% (corrida 2) de poliacrilamida. Los Rf correspondientes son 0,75 y 0,45 respectivamente.

Posteriormente se midió la actividad en geles desnaturalizantes. La proteína diluida en el buffer de siembra (1:3; v:v) se mantuvo en contacto con hielo durante 30 minutos. Se sembraron 40 µl (aproximadamente 20 µg de proteína) en cada calle y se procedió según la metodología ya descrita (ítem M-II.5). Una vez concluida la corrida,

una de las calles se tiñó con Coomassie Brilliant Blue y a la otra se le eliminó el SDS mediante un lavado con agua destilada, tres lavados de 5 minutos cada uno con 20 ml de Tritón X-100 (2,5%) y un nuevo lavado con agua destilada. Se cortó el gel en secciones de 3mm y cada trozo se dejó en el buffer de incubación conteniendo 60 μ M de PBG, durante toda la noche en cámara fría. Al día siguiente se incubó a 60°C durante 90 minutos. En la Figura R-V.2 se señala la ubicación de la banda correspondiente a la enzima en geles de 7,5 % (corrida 1) y 12 % (corrida 2) de poliacrilamida. Los Rf correspondientes son 0,65 y 0,45 respectivamente.

Se puede observar que a pesar de haber incluido en el esquema de purificación tres técnicas cromatográficas, que difieren en sus principios separativos, no se ha logrado obtener una única banda proteica. Por lo tanto para lograr este objetivo se recurrió a la técnica de electroforesis preparativa.

V.2. Electroforesis preparativa

Se reunieron las fracciones provenientes de los eluidos de la columna de Blue-Sepharosa y se concentraron hasta llegar a 1 mg/ml. Posteriormente se realizó una corrida electroforética en un gel nativo de poliacrilamida (7,5%). Como se mencionó anteriormente, en esta etapa no se observa una única banda proteica. Se cortó entonces, el trozo de gel que presentaba actividad de PBG-D para luego electroeluirlo. Sin embargo, debido a la pequeña cantidad de proteína presente, la electroelución resultó no eficiente. Para solucionar este inconveniente, el trozo de gel con actividad se sembró sobre otro gel de poliacrilamida (gel concentrador 4% y gel separador 7,5%) y se efectuó la corrida de acuerdo con lo descrito en Métodos (ítem M-II.5).

En estas condiciones se obtuvo una sola banda proteica, la cual tiene actividad de PBG-D (Figura R-V.3).

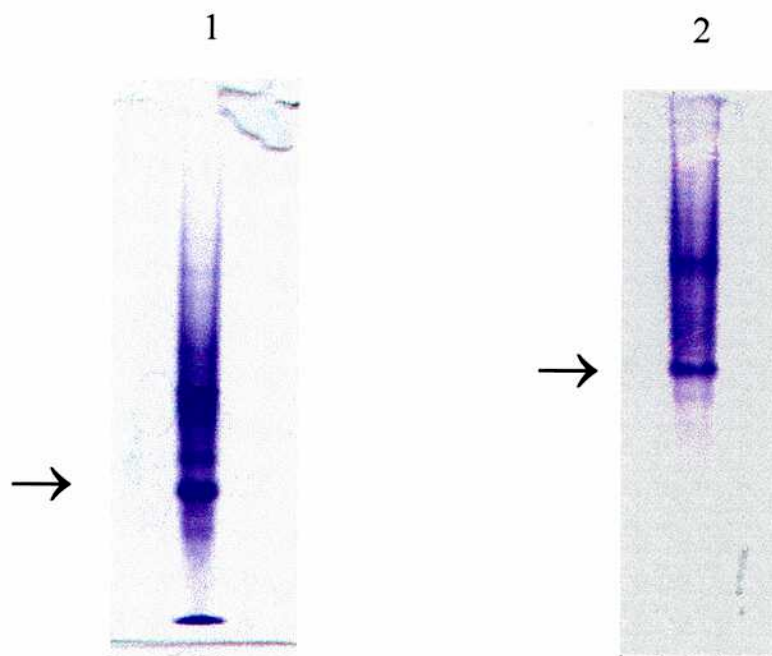


Figura R-V.1: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas. Se sembró la proteína activa eluída de la columna de Blue Sepharosa. Las flechas indican la posición de la banda con actividad en geles de 7,5% (corrida 1) y 12% (corrida 2).

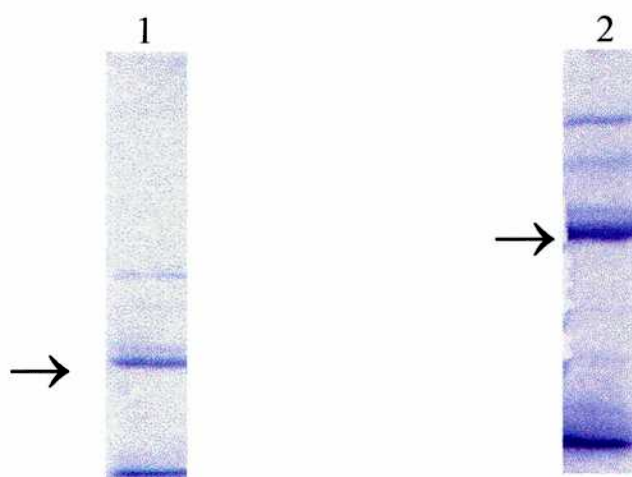


Figura R-V.2: Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Se sembró la proteína activa eluída de la columna de Blue Sepharosa. Las flechas indican la posición de la banda con actividad en geles de 7,5% (corrida 1) y 12% (corrida 2).



Figura R-V.3: Electroforesis preparativa de poliacrilamida (7,5%) en condiciones nativas. Se sembró la banda de gel según lo descrito en el texto.

V.3. Western blot

Para confirmar la presencia de una sola banda, que corresponda a la enzima PBG-D se resolvió efectuar un Western blot. En una primera etapa, se evaluó la posible reacción cruzada y se estudió la dependencia de la actividad de la PBG-D renal con la dilución del anticuerpo de conejo anti PBG-D de *Euglena gracilis* (Juknat, Doernemann & Senger; resultados no publicados). Con este fin, se preincubó el eluido activo proveniente de la columna de Blue Sepharosa a 0°C durante 1 hora con distintas concentraciones del anticuerpo de conejo anti PBG-D de *Euglena gracilis*. Finalizada la preincubación se centrifugó a 12000 rpm durante 60 minutos y se midió la actividad en el sobrenadante. La Figura R-V.4 ilustra la dependencia de la actividad remanente con el logaritmo de la dilución del anticuerpo empleado.

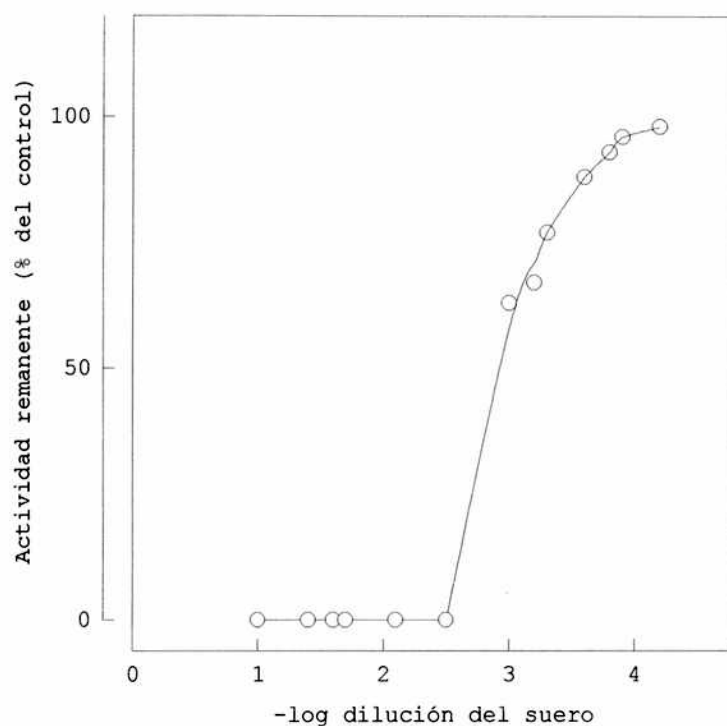


Figura R-V.4: Dependencia de la actividad de la PBG-D de riñón de rata con la dilución del anticuerpo de conejo anti PBG-D de *Euglena gracilis*.

Una vez confirmada la reacción cruzada, se realizó el Western blot siguiendo la técnica detallada en Métodos (ítem M-II.5.3). En la Figura R-V.5 se observa la aparición de una sola banda de PBG-D.



Figura R-V.5: Western blott de la PBG-D de riñón de rata.

V.4. Isoelectroenfoque

Tanto en las electroforesis nativas como en las realizadas con SDS, se ha encontrado una sola banda con actividad de PBG-D. Sin embargo, estas experiencias no permiten excluir la presencia de isoformas de la PBG-D. Con este propósito se decidió realizar un isoelectroenfoque. Los geles se prepararon incubando una solución de acrilamida (T: 4,5%), glicerol, agua, anfolito (rango 3-10) y persulfato de amonio de acuerdo con la técnica de Righetti (1980). La corrida electroforética se efectuó en una cuba refrigerada a 8°C a potencia constante (6 W), durante 1 hora. Además se fijaron un voltaje y una intensidad máxima (2000 V, 15 mA) y se realizó un preenfoco durante 30 minutos para obtener un gradiente de pH adecuado. Posteriormente se sembró el trozo de gel nativo (7,5%) que presentaba actividad de PBG-D y se realizó la corrida. Se registraron cada 5 minutos los valores de voltaje, intensidad y potencia ([Tabla R-V.1](#)) durante 1 hora. A partir del área que se encuentra bajo la curva de la [Figura R-V.6](#) se calcularon los V/h para esta corrida, siendo el mismo de 1400 V/h. Una vez transcurrido este tiempo, se cortó una zona del gel en áreas de 0,5 cm² desde el cátodo hasta el ánodo, éstas se eluyeron con una solución de KCl 1M y se midió el pH en cada uno de los eluidos resultantes ([Figura R-V.7](#)). El revelado se realizó de acuerdo con las siguientes etapas:

- Fijación: se realizó la fijación de la proteína empleando una mezcla de ácido sulfosalicílico 5% y ácido tricloroacético 10% durante 1 hora.
- Lavados: se realizaron 3 lavados de 20 minutos cada uno con una solución compuesta por metanol, ácido acético y agua (3:6:1; v:v:v).
- Tinción: se empleó una solución de Coomassie Brilliant Blue R250 0,2% en solución lavadora durante 1 hora.
- Desteñido: se efectuó con la solución de los lavados hasta aclarar el fondo.

El isoelectroenfoque de la PBG-D proveniente de una electroforesis preparativa reveló la presencia de una sola banda proteica ([Figura R-V.8](#)), confirmando así la homogeneidad de esta fracción. El pI fue de 4,9. Este valor coincide con el hallado en

hígado de rata (Mazzetti & Tomio, 1988) y se encuentra dentro del rango obtenido para la misma enzima de otras fuentes (Jones & Jordan, 1994).

Tabla R-V.1: Variación de los parámetros eléctricos con el tiempo

Tiempo (min.)	Voltaje (V)	Intensidad (mA)	P (W)
5	590	9,8	6
10	740	7,9	6
15	850	6,9	6
20	950	6,2	6
25	1030	5,7	6
30	1100	5,3	6
35	1130	5,2	6
40	1200	4,9	6
45	1320	4,5	6
50	1460	4,0	6
55	1490	3,9	6
60	1910	3,1	6

Las medidas se han registrado luego de efectuar la siembra.

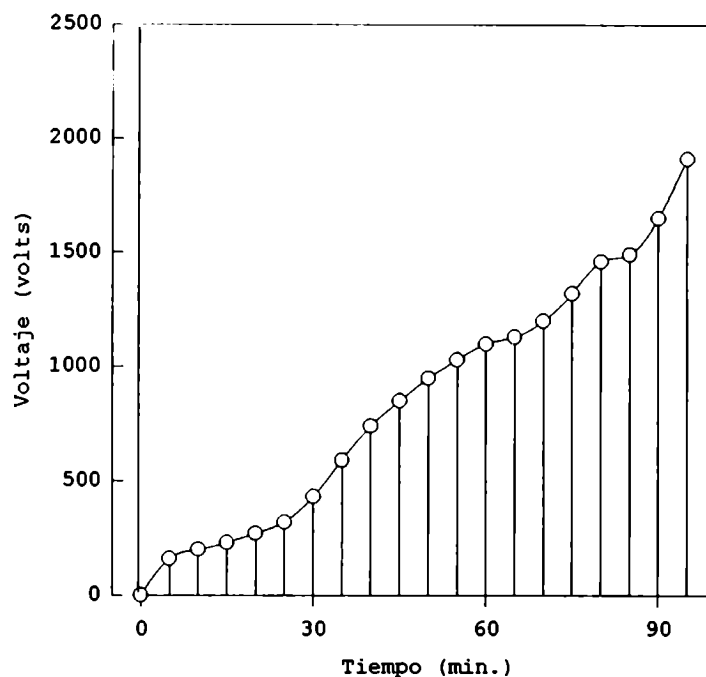


Figura R-V.6: Integración Voltaje-tiempo. Se graficó la variación del voltaje con el tiempo. Los primeros 30 minutos corresponden al preenfque.

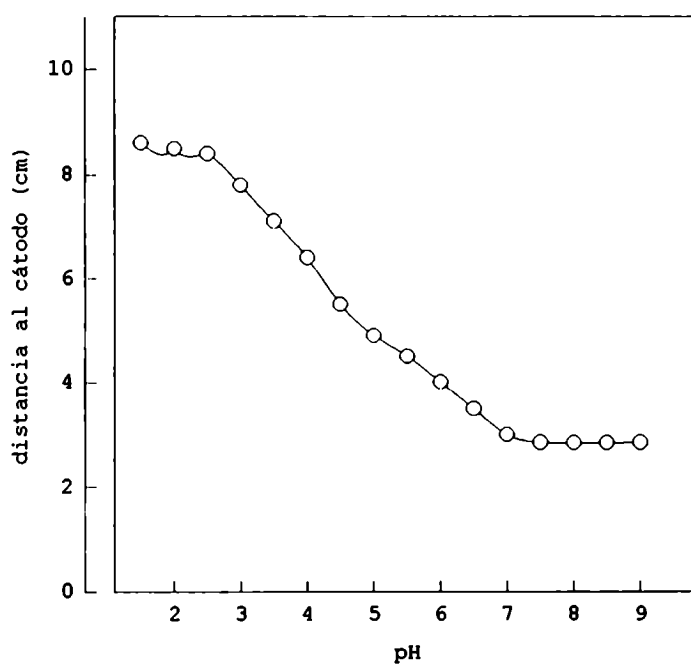


Figura R-V.7: Gradiente de pH. La obtención del gradiente y la medición del pH se encuentran detallados en el texto.

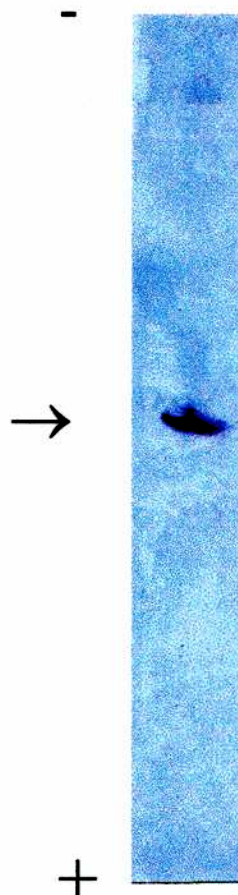


Figura R-V.8: Isoelectroenfoque correspondiente a la PBG-D de riñón de rata. Las condiciones experimentales se encuentran detalladas en el texto.

CAPITULO VI

PBG-Deaminasa de riñón de rata. Acción de distintos efectores sobre la cinética de la reacción

	Página
VI.1. Acción de una mezcla de NaCl-MgCl ₂	192
VI.2. Efecto de iones.....	193
VI.2.1 Efecto del ion sodio.....	193
VI.2.2 Efecto del ion magnesio.....	197
VI.2.3 Efecto del anión fosfato.....	202
VI.2.4 Efecto del ion amonio.....	207
VI.2.5 Efecto de los cationes zinc, cadmio y cobalto.....	214
VI.3. Acción de distintos efectores sobre la actividad de la PBG-D de riñón de rata.....	216
VI.3.1 Efecto del ácido fólico y la sulfamerazina sobre distintas fracciones de PBG-D de riñón de rata.....	216
VI.3.2 Efecto de reactivos de grupos tioles y disulfuros.....	219

VI. PBG-DEAMINASA DE RIÑÓN DE RATA. ACCION DE DISTINTOS EFECTORES SOBRE LA CINÉTICA DE LA REACCIÓN

Teniendo en cuenta la cinética compleja y poco común que presenta la PBG-D de riñón de rata, se decidió estudiar la acción de distintos efectores para tratar de dilucidar su mecanismo cinético. Además se evaluará el efecto de protectores e inhibidores de grupos tioles y disulfuros.

VI.1. Acción de una mezcla de NaCl-MgCl₂

Dado que esta mezcla de sales manifestó un efecto estimulante sobre la actividad de la PBG-D hepática en las fracciones crudas (H y S), donde está presente la Isomerasa, pero inhibitorio a partir de la etapa de calentamiento (S₀) (ítem R-III.3.1), se decidió estudiar su acción sobre la PBG-D renal.

Se empleó una mezcla de NaCl 0,6 M y MgCl₂ 0,12 M (1:1 v:v) y se ensayó su efecto sobre las fracciones H, S, S₀ y F_s. La Tabla R-VI.1 muestra los resultados que se obtuvieron en incubaciones llevadas a cabo en ausencia y presencia de 0,2 y 0,4 ml de dicha mezcla salina.

En estas experiencias también se observa una activación en aquellas fracciones en las que se encuentra presente la Cosintetasa. El efecto activante es máximo (80%) cuando se incuba el extracto H en presencia de 0,4 ml de la mezcla. Por otra parte no hay efecto sobre la actividad de la PBG-D en las fracciones obtenidas posteriormente al calentamiento: S₀ y F_s. Considerando estos resultados se decidió no incorporar esta mezcla salina en las incubaciones realizadas con los extractos enzimáticos obtenidos a partir de la etapa de calentamiento.

Tabla R-V.1: Efecto de la mezcla NaCl-MgCl₂

Fracción	Porfirinas formadas (nmoles /mg)		
	NaCl + MgCl ₂ (ml)		
	0	0,2	0,4
H	0,05	0,08	0,09
S	0,10	0,16	0,13
S ₀	0,50	0,50	0,40
F _s	0,70	0,70	0,60

La obtención de las distintas fracciones enzimáticas, así como el sistema de incubación empleado se detallan en Métodos. La concentración final de sodio y magnesio fue de 60 y 12 mM (0,2 ml) y 120 mM y 24 mM (0,4ml) respectivamente. Los errores en las determinaciones no exceden el 5 - 8%.

VI.2. Efecto de iones

VI.2.1 Efecto del ion sodio

Dado que la proteína se eluye de las columnas de Q-Sepharosa y Blue-Sepharosa con NaCl 0,5-0,6 M y 1,1 M respectivamente (ítem R-II.3), se decidió estudiar el efecto de los iones sodio en su forma cloruro sobre la actividad de la PBG-D de riñón de rata. La Tabla R-VI.2 muestra los resultados obtenidos al incubar la enzima en presencia de distintas concentraciones de NaCl. La máxima inhibición alcanzada (45%) se logró al incubar con la mayor concentración ensayada (NaCl 2,0 M).

Tabla R-VI.2: Efecto de distintas concentraciones de NaCl sobre la actividad de la PBG-D de riñón de rata

Sistema	Porfirinas formadas (nmoles/mg)	inhibición (%)
control	$0,70 \pm 0,03$	0
[Na ⁺] 0,10 M	$0,61 \pm 0,03$	13
0,50 M	$0,48 \pm 0,03$	30
1,00 M	$0,42 \pm 0,03$	40
2,00 M	$0,39 \pm 0,02$	45

La obtención de la fracción F_s y el sistema de incubación se detallan en Métodos.

Por otro lado, durante los estudios de velocidades iniciales realizados empleando fracciones enzimáticas provenientes de las columnas de Q-Sepharosa y Blue-Sepharosa, se observó que las actividades medidas en presencia de NaCl mostraban gráficos de inversas con una sola pendiente, mientras que los correspondientes a las mismas fracciones pero dializadas, mostraban dos pendientes (ítem R-IV.2). Se decidió entonces analizar el efecto de estas concentraciones (0,5 y 1,0 M) sobre la cinética de la fracción F_s . Los resultados obtenidos son llamativos y sumamente interesantes (Figura R.VI.1).

Comparando el control con los incubados con sodio 0,5 M, los gráficos de Lineweaver-Burk muestran dos pendientes (Figura R.VI.1.A-B) con un punto de inflexión que se trasladó de 7 a 15 μM (Tabla R-VI.3).

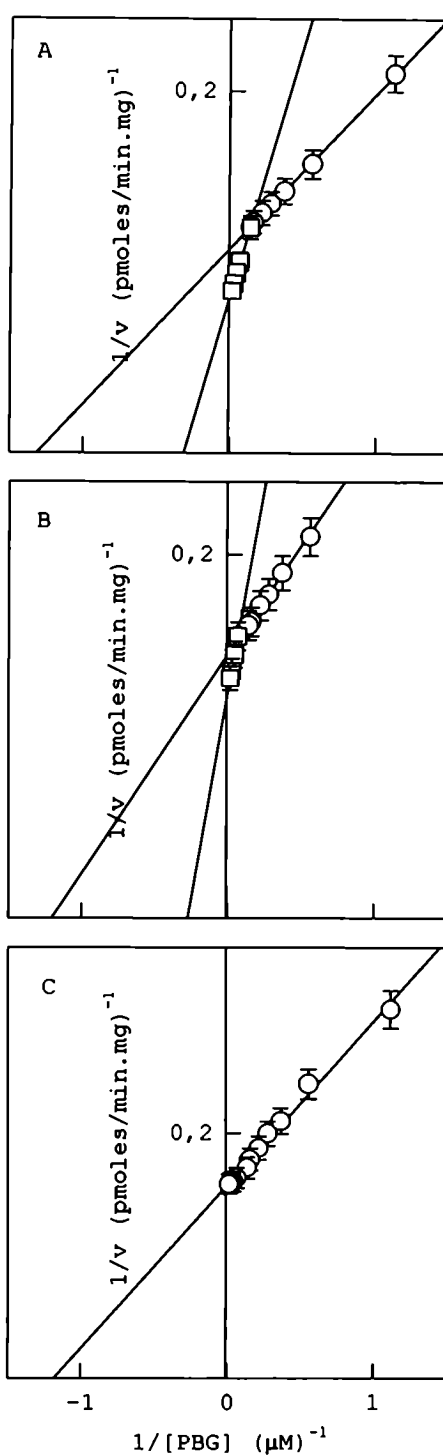


Figura R-VI.1: Efecto del ion sodio sobre la cinética de la reacción. Gráficos de Lineweaver - Burk en ausencia (A) y en presencia de sodio 0,5 M (B) y 1,0 M (C). A: [PBG]: 0 - 7 μM , r : 0,998; [PBG]: 7 - 66 μM , r : 0,999; B: [PBG]: 0 - 15 μM , r : 0,999; [PBG]: 15 - 66 μM , r : 0,999; C: [PBG]: 0 - 66 μM , r : 0,991.

Tabla R.VI.3.: Efecto del ion sodio sobre las constantes cinéticas

[NaCl] (M)	[PBG] (μ M)	K _m (μ M)	V _m (pmoles/min.mg)	Coefficiente de Hill
0	0,8 - 7	$0,8 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,7$	1
	7 - 66	$3,2 \pm 0,4$	$11,5 \pm 0,9$	1
0,5	0,8 - 15	$0,8 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,6$	1
	15 - 66	$3,7 \pm 0,4$	$8,1 \pm 0,6$	1
1,0	0,8 - 66	$0,8 \pm 0,1$	$6,3 \pm 0,5$	1

La obtención de la fracción Fs y el sistema de incubación se detallan en Métodos.

Aumentando la concentración de sodio a 1,0 M el punto de inflexión desaparece y los gráficos de inversas muestran una sola pendiente (Figura R-VI.1.C). Tras un análisis de las constantes cinéticas (Tabla R-IV.3) se observa un descenso en la V_m, el cual a 1,0 M de NaCl es de 28 a 45%, dependiente del rango de PBG analizado, y un K_m de 0,8 μ M, coincidente con el correspondiente al menor rango de concentración de sustrato, tanto para el control como para los incubados con 0,5 M. Estos resultados podrían indicar la presencia de dos sitios activos independientes con diferentes constantes cinéticas, los cuales serían inhibidos en forma diferencial por el sodio. Sin embargo, esta conclusión no estaría de acuerdo con los resultados presentados en el capítulo IV (R-IV.2), donde en presencia de sodio el K_m es 5,0 - 5,2 μ M y varía en ausencia del mismo; pero debemos recordar que estamos comparando fracciones enzimáticas de distinto grado de purificación.

VI.2.2 Efecto del ion magnesio

Recordemos que en los estudios realizados con la enzima hepática (ítem R-III.3.4), el magnesio inhibía la actividad de la deaminasa en todo el rango de concentraciones empleado. La inhibición resultó máxima (88%) en el rango 150-200 mM a una concentración saturante de sustrato (66 μ M) y los estudios de velocidades iniciales mostraron un modelo cinético incompetitivo.

Con el fin de conocer la respuesta de la PBG-D renal, en una primera experiencia, se incubaron cantidades variables de cloruro de magnesio (0-200 mM) manteniendo una concentración de PBG saturante de 66 μ M (Figura R-VI.2). Se observó una inhibición máxima del 80% en la formación de uroporfirina I, cuando el rango de magnesio fue de 150-200 mM.

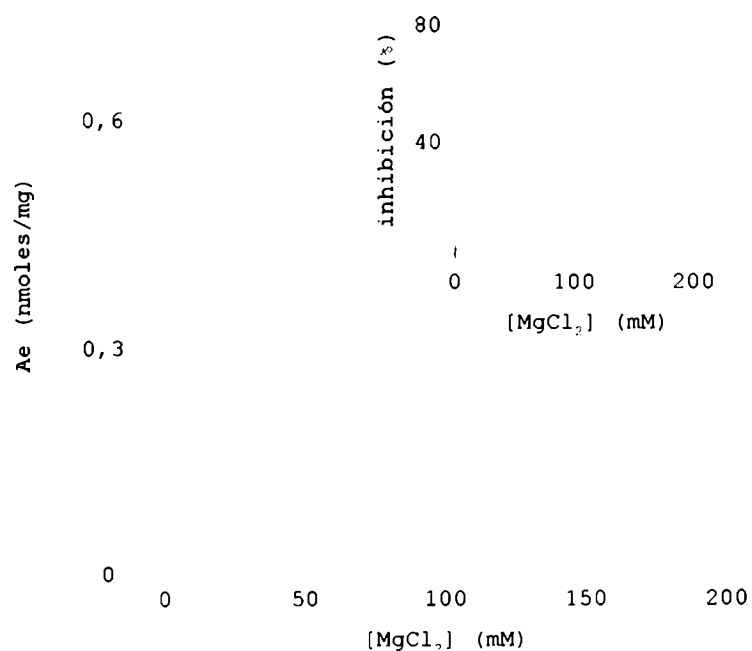


Figura R-VI.2: Efecto de concentraciones variables de magnesio sobre la actividad de la PBG-D de riñón de rata. Se empleó la fracción F_s y se incubó de acuerdo con lo detallado en Métodos.

Para obtener mayor información acerca de la acción de este catión, se midieron las velocidades iniciales de formación de porfirinas en presencia de cantidades variables de inhibidor (0 - 50 mM). Dado que para esta enzima los gráficos de dobles recíprocas resultaron no lineales y se obtuvieron dos pendientes, se decidió representar separadamente los resultados obtenidos con altas (7 - 66 μM) y con bajas concentraciones de PBG (0,8 - 7,0 μM).

La Figura R-VI.3 indica que en las incubaciones realizadas con altas concentraciones de sustrato el ion magnesio se comporta como un inhibidor no competitivo, afectando la V_m sin modificar el K_m de la enzima (Tabla R-VI.4).

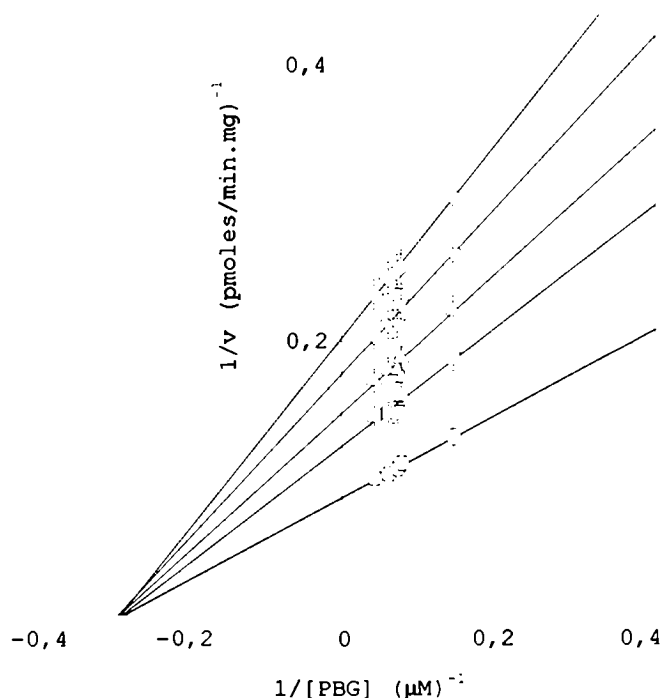


Figura R-VI.3: Gráfico de dobles recíprocas en ausencia (O, $r: 0,988$) y presencia de ion magnesio 14 mM ($\square$, $r: 0,927$), 25 mM (Δ , $r: 0,979$), 37 mM (∇ , $r: 0,968$) y 50 mM ($\diamond$, $r: 0,994$). La obtención de la fracción enzimática F_s y el sistema de incubación se encuentran detallados en Métodos.

Tabla R-VI.4: Efecto del ion magnesio sobre las constantes cinéticas de la PBG-D incubada con altas concentraciones de sustrato

Sistema	Km (μM)	Vm (pmoles/min.mg)	Coefficiente de Hill
control	$3,4 \pm 0,4$	$11,6 \pm 0,6$	1
[Mg ⁺⁺] 14mM	$3,4 \pm 0,4$	$8,3 \pm 0,5$	1
25 mM	$3,4 \pm 0,4$	$6,8 \pm 0,4$	1
37 mM	$3,4 \pm 0,4$	$5,7 \pm 0,3$	1
50 mM	$3,4 \pm 0,4$	$5,0 \pm 0,3$	1

Los datos se calcularon a partir de la Figura R.VI.3.

Regraficando las intersecciones y las pendientes de la Figura R-VI.3 en función de las concentraciones del inhibidor se establece que la inhibición no competitiva es de tipo lineal. Los valores de K_i obtenidos fueron coincidentes, K_{ii} : 37 ± 4 mM y K_{ip} : 37 ± 4 mM, donde K_{ii} y K_{ip} representan las constantes de inhibición que afectan la intersección y la pendiente respectivamente (Figura R-VI.4 A-B).

Al variar la concentración de PBG entre 0,8 y 7,0 μM el ion magnesio se comportó como un inhibidor incompetitivo (Figura R-VI.5), con un K_{ii} de 139 ± 3 mM (Figura R-VI.6).

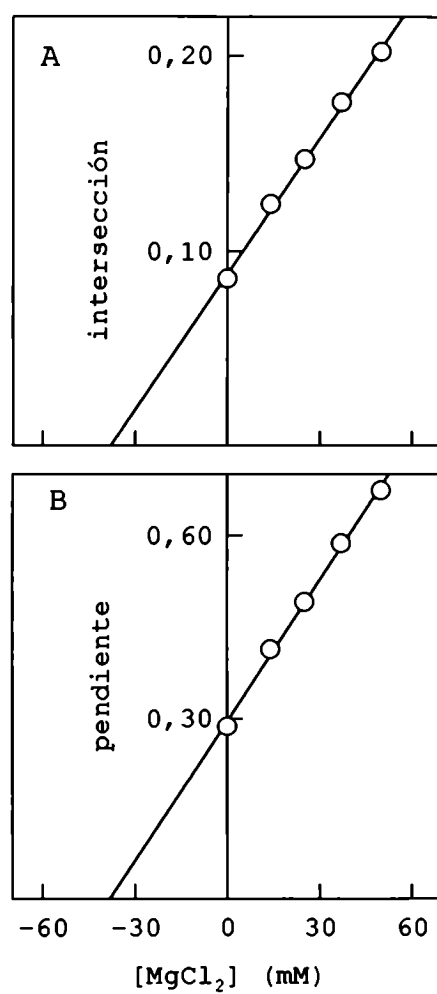


Figura R-VI.4: Variación de la intersección (A, $r: 0,997$) y la pendiente (B, $r: 0,997$) obtenidas del gráfico de dobles recíprocas (Figura R-VI.3) en función de la concentración del ion magnesio.

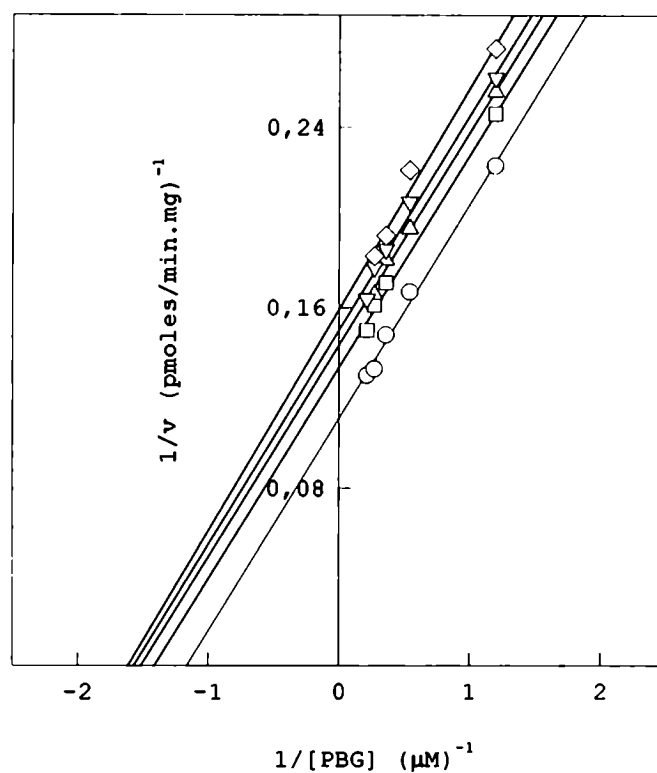


Figura R-VI.5: Gráfico de dobles recíprocas en ausencia (O, r: 0,991) y presencia de ion magnesio 14 mM (□, r: 0,995), 25 mM (Δ, r: 0,995), 37 mM (∇, r: 0,986) y 50 mM (◊, r: 0,982). La concentración de PBG varió entre 0,8 y 4,7 μM . La obtención de la fracción enzimática F_s y el sistema de incubación están detallados en Métodos. Los errores en las determinaciones no exceden el 5 - 8%.

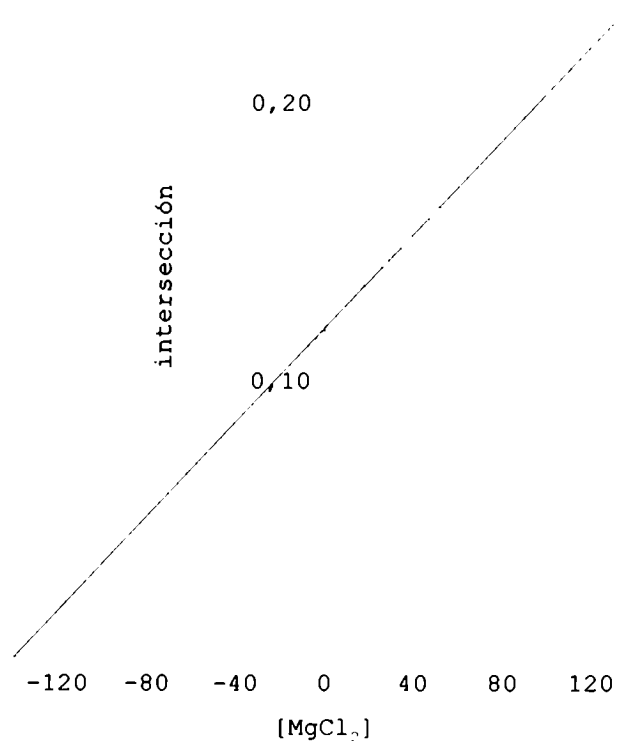


Figura R-VI.6: Variación de la intersección del gráfico de dobles recíprocas (**Figura R-VI.5**) en función de la concentración del ion magnesio ($r: 0,975$).

VI.2.3 Efecto del anión fosfato

La PBG-D de hígado de rata presentó una interesante respuesta frente al anión fosfato (ítem R-III.3.3). Teniendo en cuenta que la enzima renal manifiesta un comportamiento cinético distinto al de la hepática, y considerando que el par $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ participa en la regulación ácido - base en los túbulos renales, resultó de interés efectuar estudios cinéticos en presencia del anión fosfato.

En una primera experiencia se establecieron las concentraciones óptimas del inhibidor para los estudios de velocidades iniciales. Para ello se incubaron cantidades variables de fosfato diácido, a concentraciones saturantes de sustrato ($66 \mu\text{M}$) (**Figura**

R-VI.7). Tal como sucedió con la enzima hepática el fosfato diácido inhibió la formación de porfirinas siendo este efecto de un 83% a 120-150 mM.

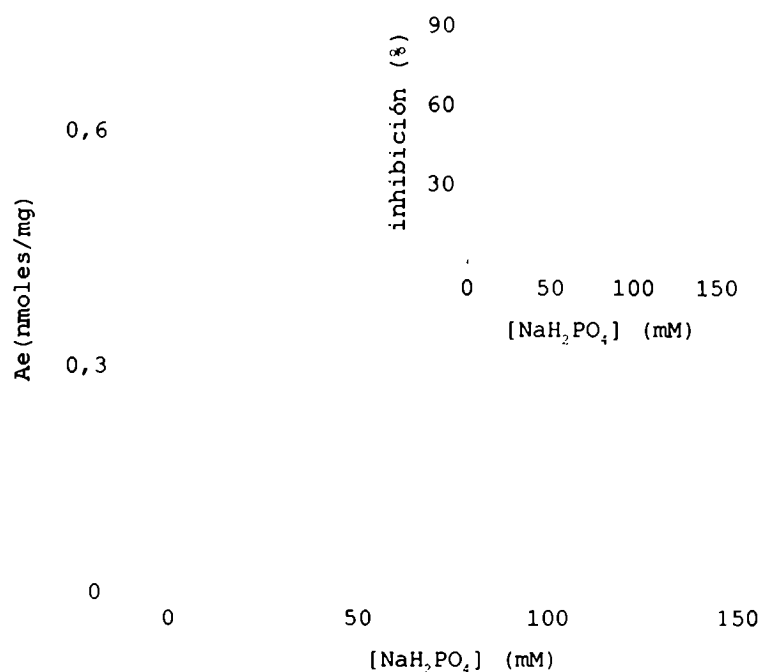


Figura R-VI.7: Efecto de distintas concentraciones de fosfato diácido sobre la actividad de la PBG-D de riñón de rata. Se incubó de acuerdo con lo detallado en Métodos, empleando la fracción F_s.

Al efectuar los estudios de velocidades iniciales empleando el rango de concentraciones de PBG de 7 a 66 μ M, el gráfico de dobles recíprocas mostró que el fosfato diácido se comporta como un inhibidor no competitivo (Figura R-VI.8), el cual a concentración 40 mM produjo una reducción de la V_m de un 50% respecto al control (Tabla R-VI.5).

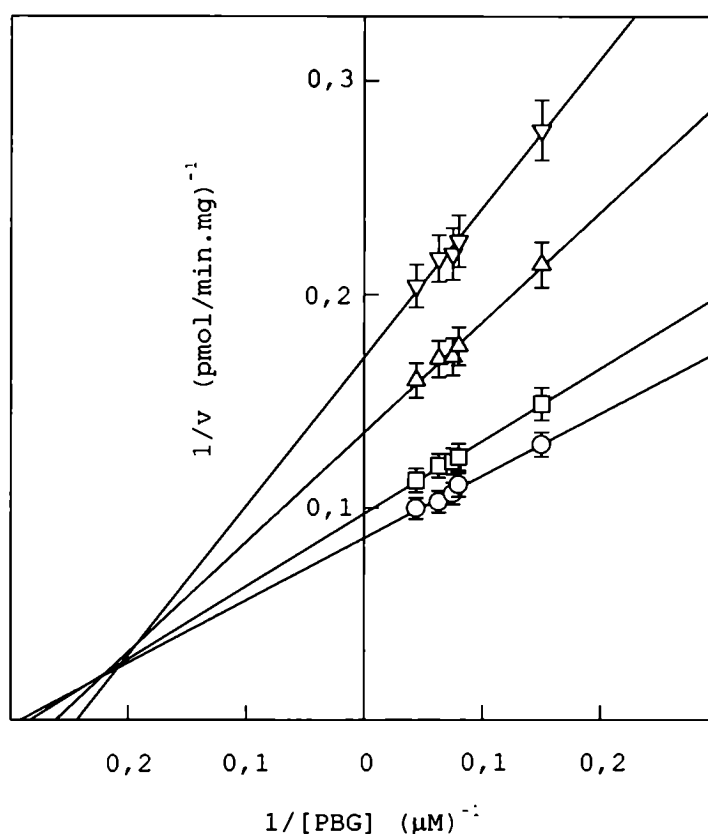


Figura R-VI.8: Gráfico de doubles recíprocas. Se midieron velocidades iniciales en ausencia (O, r : 0,988) y en presencia de NaH_2PO_4 12 mM ($\square$, r : 0,996); 25 mM (Δ , r : 0,989) y 40 mM (∇ , r : 0,990). La obtención de la fracción enzimática F_s y el sistema de incubación utilizado para la determinación de velocidades iniciales se encuentran detallados en Métodos.

Tanto las pendientes como las intersecciones de la [Figura R-VI.8](#) son funciones lineales de la concentración de fosfato diácido. Las constantes K_i que se obtuvieron a partir de la [Figura R-VI.9](#) son las siguientes: K_{ii} : $32,9 \pm 3,9$ mM y K_{ip} : $22,5 \pm 2,7$ mM.

Es interesante señalar que cuando se estudió la acción del fosfato diácido a bajas concentraciones de sustrato ($0,8 - 7,0$ μM), se observó la aparición de un efecto dual ([Figura R-VI.10](#)).

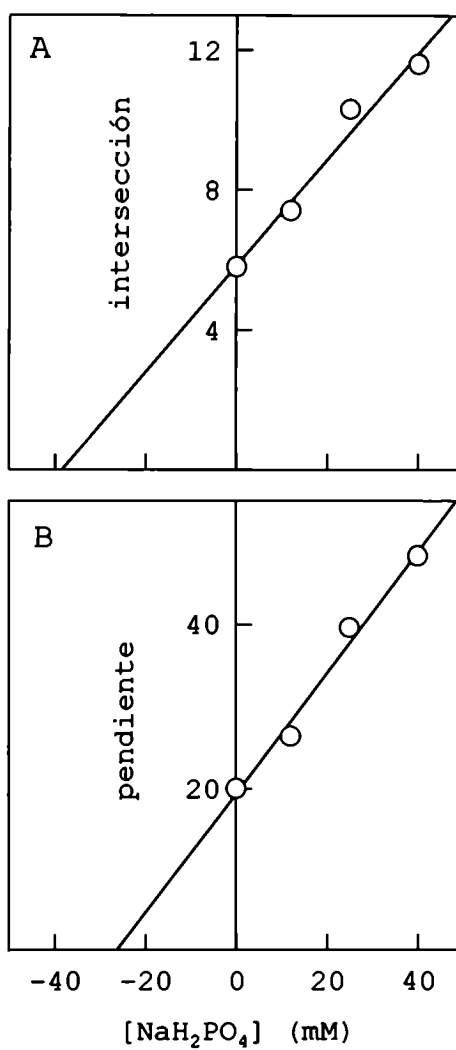


Figura R-VI.9: Variación de la intersección (A, $r: 0,971$) y la pendiente (B, $r: 0,985$) del gráfico de dobles recíprocas (Figura R-VI.8) en función de la concentración de NaH_2PO_4 .

Tabla R-VI.5: Efecto del H_2PO_4^- sobre las constantes cinéticas de la PBG-D incubada con altas concentraciones de sustrato

Sistema	Km (μM)	Vm (pmoles/min.mg)	Coeficiente de Hill
control	$4,2 \pm 0,2$	$11,6 \pm 0,6$	1
$[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$ 12 mM	$3,9 \pm 0,2$	$10,2 \pm 0,5$	1
25 mM	$3,6 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,4$	1
40 mM	$3,5 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,3$	1

Los datos tabulados se calcularon a partir de la Figura R-VI.8.

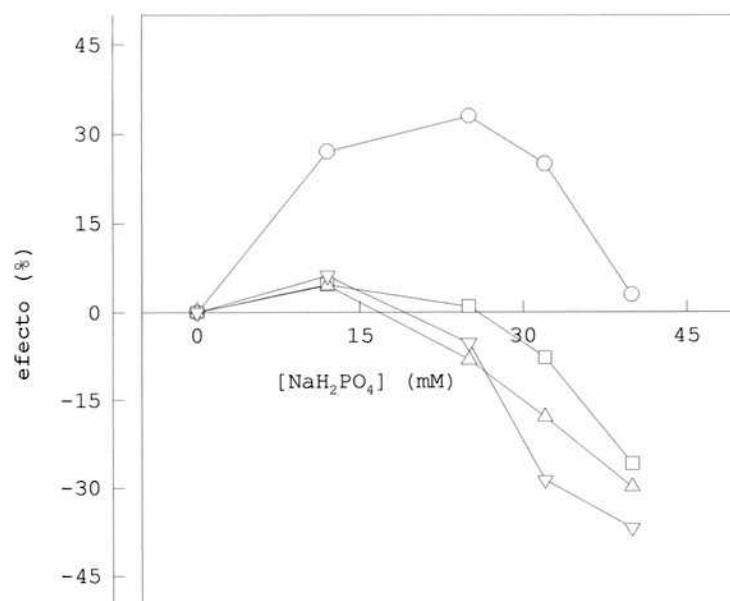


Figura R-VI.10: Efecto de distintas concentraciones de fosfato diácido sobre la actividad de la PBG-D de riñón de rata a bajas concentraciones de PBG (O) 0,8 μM ; ($\square$) 1,9 μM ; (Δ) 2,8 μM ; (∇) 3,7 μM .

La enzima manifiesta una activación máxima del 33% cuando la concentración de fosfato diácido es 25 mM y la de PBG 0,8 μ M (Figura R-VI.10). En incubaciones empleando mayores concentraciones de PBG, hasta 5 μ M, y de efector, entre 30 y 40 mM, se observó el efecto inhibitorio del fosfato.

Estos resultados señalan que el anión fosfato diácido presenta un comportamiento complejo frente a la cinética de la PBG-D renal. Puede actuar como un activador -inhibidor o como un inhibidor no competitivo dependiendo del rango de concentraciones de PBG empleado. Por otro lado, su comportamiento como activador-inhibidor depende de su concentración. El efecto activante observado puede explicarse en términos de la existencia de algún fenómeno de cambio conformacional que le brindaría a la enzima una conformación estructural óptima para expresar una mayor actividad. Por otra parte se ha demostrado que ciertos grupos cargados positivamente, como los residuos arginina, están involucrados en la iniciación y propagación de la polimerización del sustrato (Jordan & Woodcock, 1991). Estos grupos servirían para estabilizar la formación de intermediarios, vía reconocimiento del PBG a través de sus cadenas acetato y propionato. De esta manera se propuso que el ion fosfato podría neutralizar total o parcialmente estas posiciones y de ser así, podría ocurrir que el PBG no se uniera en forma correcta al sitio activo de la PBG-D y se formarían complejos del tipo E-PBG-I y E-I (Kotler *et al.*, 1987b). Así, la cadena polipirrólica no podría crecer hasta formar el tetrapirrol, dando origen a una inhibición del tipo no competitivo.

VI.2.4 Efecto del ion amonio

El principal papel que desempeña el ion amonio en el riñón es su participación en el equilibrio ácido - base. El amoníaco se sintetiza a partir de la glutamina por acción de la enzima glutaminasa. Este aminoácido ingresa a las células epiteliales del túbulo proximal, del asa de Henle y de los túbulos distales mediante un transporte activo. Una vez dentro de la célula cada molécula de glutamina se metaboliza para formar dos iones NH_4^+ y dos iones HCO_3^- . Una de las características más relevantes del sistema $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$

es que está sujeto a control fisiológico. La disminución del pH estimula el metabolismo renal de la glutamina y como consecuencia de ello aumenta la síntesis de NH_4^+ y HCO_3^- . Así en la acidosis crónica, el mecanismo dominante es la excreción de NH_4^+ . Por supuesto, el aumento del pH produce un efecto opuesto.

Estudios realizados en nuestro laboratorio demostraron que el ion amonio puede actuar a nivel de la ciclación y/o isomerización del tetrapirrol, modificando fundamentalmente la cantidad total y/o el tipo isomérico de las porfirinas formadas, sin afectar el consumo de PBG (Llambías & Batlle, 1970a,b; 1971a,b; Rossetti & Batlle, 1977). Llambías & Batlle (1970a) estudiaron el comportamiento cinético de la PBG-asa y la PBG-D de callos de soja en ausencia y presencia de iones amonio. En ausencia del inhibidor las curvas de saturación de ambas enzimas eran muy semejantes. A bajas concentraciones de sustrato (0-100 μM) observaron curvas michaelianas mientras que con altas concentraciones (100-250 μM) la velocidad aumentaba sin alcanzar una segunda zona de saturación. En cambio, en presencia de iones amonio 100 mM, a bajas concentraciones de PBG el perfil cinético obtenido fue sigmoideo y con altas concentraciones de sustrato se alcanzó una segunda zona de saturación para la PBG-asa, no así para la PBG-D.

Teniendo en cuenta el complejo comportamiento que presenta la enzima PBG-D de riñón, resultó de interés estudiar la acción de este efector sobre la cinética de la misma. Se incubaron concentraciones variables de NH_4Cl en presencia de 1 mg de proteína y PBG a concentración saturante (66 μM) durante 1 hora (Figura R-VI.11). Se observa que la inhibición alcanzada es máxima (35%) a 300 mM de amonio.

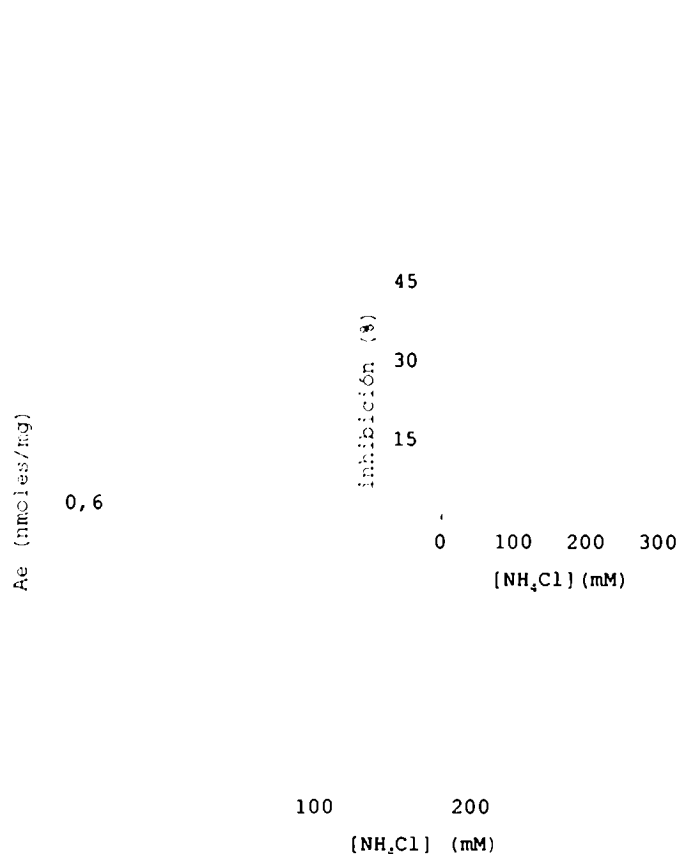


Figura R-VI.11: Efecto del amonio sobre la actividad de la PBG-D de riñón de rata. Se incubó de acuerdo con lo detallado en Métodos, empleando la fracción F_s .

En la Figura R-VI.12 se graficaron las velocidades iniciales obtenidas al variar la concentración de PBG, a distintos tiempos (0-20 min.) en ausencia y presencia de 150 y 300 mM de amonio. Se puede observar nuevamente la aparición de las curvas complejas pero ya clásicas de la PBG-D de riñón, así como también la inhibición producida por ambas concentraciones de amonio. Para confirmar lo ya expuesto se realizaron los gráficos de Lineweaver-Burk (Figura R-VI.13). Los resultados obtenidos son sumamente interesantes, dado que aparecen las dos pendientes, pero el punto de inflexión se desplaza a valores inferiores de 7 μ M de PBG conforme aumenta la concentración de amonio (Tabla R-VI.6).

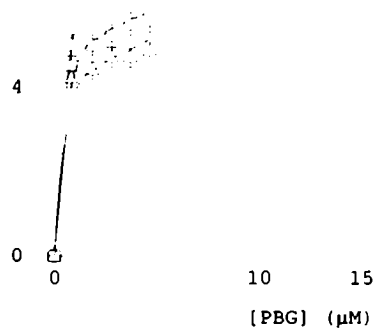


Figura R-VI.12: Efecto de concentraciones variables de PBG sobre la velocidad de formación de porfirinas en ausencia (O) y en presencia de amonio 150 mM (□) y 300 mM (Δ). La obtención del extracto proteico F_s y la medición de las velocidades iniciales se realizaron de acuerdo a lo establecido en Métodos.

El desplazamiento del punto de inflexión produce un descenso en el K_m de $0,6 \pm 0,1 \mu M$ a $0,13 \pm 0,02 \mu M$ (78%) en el rango de menores concentraciones de sustrato, mientras que para el rango mayor, el K_m no varía ($2,9-3,4 \mu M$) (Tabla R-VI.6). Incubaciones con concentraciones mayores de amonio no lograron ni aumentar la inhibición ni afectar las dos pendientes, en comparación con 300 mM de amonio.

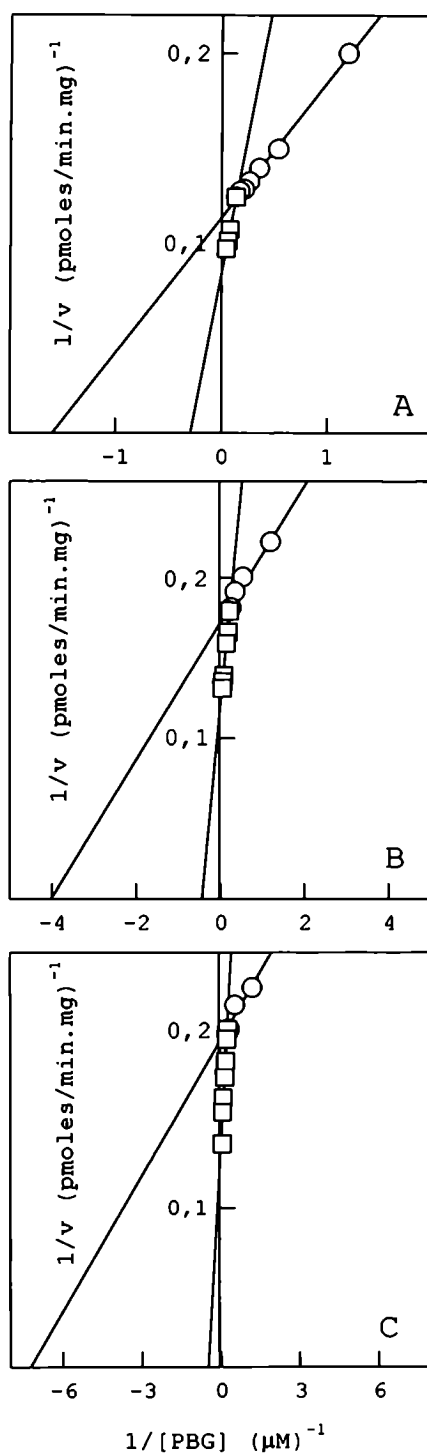


Figura R-VI.13: Efecto del ion amonio sobre la cinética de la reacción. Gráficos de Lineweaver - Burk en ausencia (A) y en presencia de amonio 150 mM (B) y 300 mM (C). A: [PBG]: 0,8 - 7,0 μM , r : 0,998; [PBG]: 7 - 66 μM , r : 0,998; B: [PBG]: 0,8 - 4,5 μM , r : 0,996; [PBG]: 4,5 - 66 μM , r : 0,978; C: [PBG]: 0,8 - 3,7 μM , r : 0,968; [PBG]: 3,7 - 66 μM , r : 0,940.

Tabla R-VI.6: Efecto del amonio sobre las constantes cinéticas de la PBG-D de riñón

Sistema	[PBG] (μM)	K_m (μM)	V_m (pmoles/min.mg)	Coeficiente de Hill
control	0,8-7,0	$0,6 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,5$	1
	7-66	$3,4 \pm 0,4$	$11,9 \pm 0,7$	1
[NH ₄ ⁺] 150 mM	0,8-4,5	$0,24 \pm 0,03$	$8,5 \pm 0,5$	1
	4,5-66	$2,9 \pm 0,3$	$5,8 \pm 0,4$	1
300 mM	0,8-3,7	$0,13 \pm 0,02$	$4,9 \pm 0,4$	1
	3,7-66	$3,1 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,4$	1

Los datos tabulados se calcularon a partir de la [Figura R-VI.13](#).

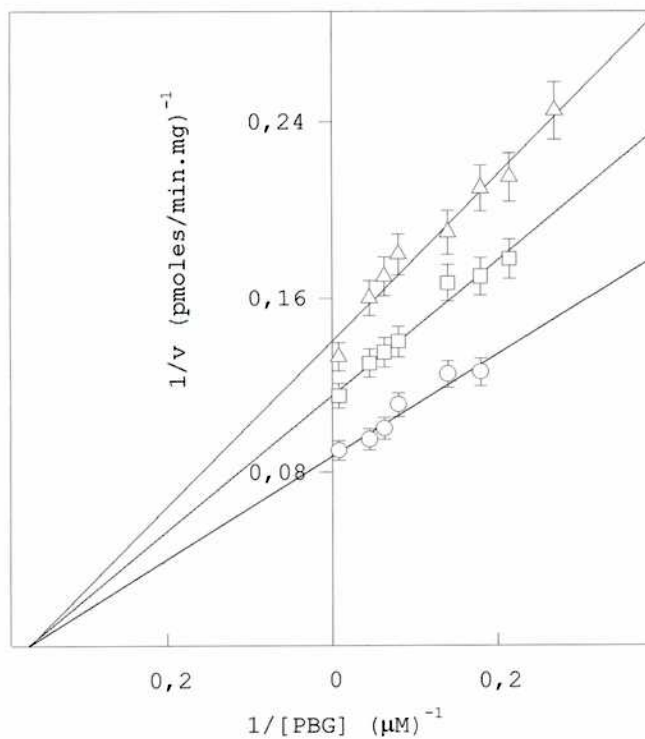


Figura R-VI.14: Representación de Lineweaver-Burk para la velocidad de formación de porfirinas en ausencia (O, r : 0,938) y en presencia de cloruro de amonio 150 mM (□, r : 0,972) y 300 mM (Δ, r : 0,965).

A altas concentraciones de sustrato (7 - 66 μM) el ion amonio se comporta como un inhibidor no competitivo (Figura R-VI.14) mientras que a bajas concentraciones de PBG (1 - 4 μM) el efecto inhibitorio del ion amonio es más marcado cuanto mayor es la concentración de sustrato incubada, siendo la máxima inhibición lograda del 38 % para amonio 300 mM y 4 μM de PBG (Figura R-VI.15).

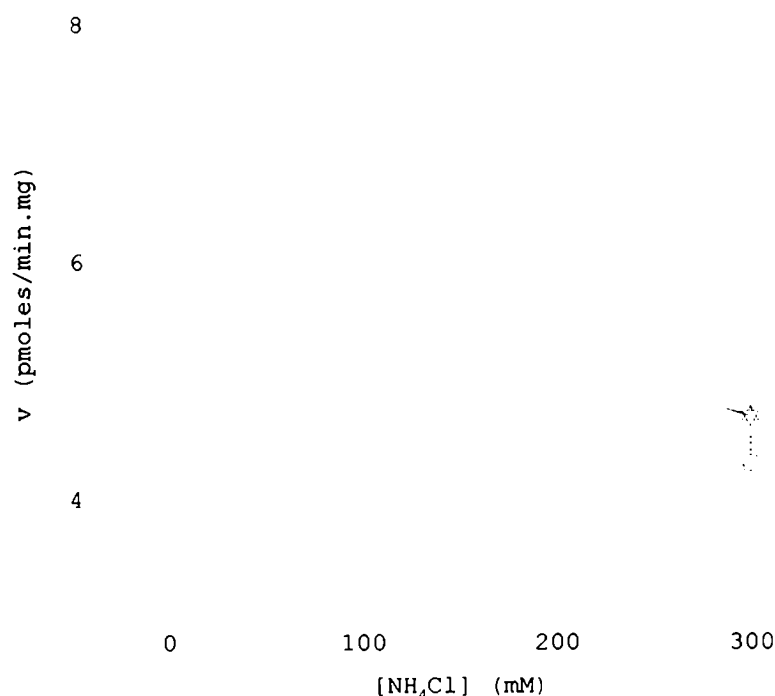


Figura R-VI.15: Efecto del amonio sobre la velocidad de formación de porfirinas a bajas concentraciones de sustrato; PBG 1 μM (O, r: 0,990), 2 μM ($\square$, r: 0,985), 3 μM (Δ) y 4 μM (∇).

Juknat (1983) estudió el efecto del amonio sobre el sistema enzimático de la PBG-asa de *Rp. palustris*. En ese caso el amonio disminuyó la cantidad total de porfirinas formadas a concentraciones crecientes de inhibidor y sustrato, modificando

sólo ligeramente la cinética cooperativa de la reacción. Cuando estos estudios se llevaron a cabo con la PBG-D de esta misma fuente se encontró que el amonio inhibía no competitivamente a la enzima, sin afectar su comportamiento michaeliana (Kotler *et al.*, 1987b).

Recordemos que Battersby *et al.* (1982) sugirieron un mecanismo de acción para la PBG-D, en el cual la enzima formaría un intermediario azafulveno que sería liberado al medio. Este compuesto se trasformaría rápidamente por acción del agua en el 1-hidroximetilbilano o preuroporfirinógeno, el cual se cicla no enzimáticamente para formar el uroporfirinógeno I. El agregado de nucleófilos, tales como las bases nitrogenadas de bajo peso molecular y en nuestro caso el amonio, originaría una competencia entre los mismos y el agua por el azafulveno, produciendo bilanos moderadamente estables que se acumularían en el medio e impedirían la síntesis final del producto.

VI.2.5 Efecto de los cationes zinc, cadmio y cobalto

El zinc y el cobalto son elementos esenciales, que se incorporan con la dieta y se distribuyen por todo el organismo. El cadmio tiene propiedades físico-químicas similares al zinc y acompaña a éste en la naturaleza. Análogamente al plomo, el cadmio inhibe la actividad de las enzimas que poseen grupos sulfhidrilos esenciales en el sitio activo. Dado que el riñón es el órgano donde por excelencia se acumulan los metales pesados, se decidió estudiar el efecto de distintas concentraciones de zinc, cobalto y cadmio, en forma de cloruro, sobre la actividad de la PBG-D renal. Los tres cationes ensayados inhibieron en distinto grado y dependiendo de su concentración, la formación de uroporfirina I (Tabla R-VI.7).

Tabla R-VI.7: Efecto de los cationes Zn^{++} , Cd^{++} y Co^{++}

Catión	Porfirinas formadas (nmoles/mg)	Inhibición (%)
Control	$0,70 \pm 0,03$	0
[Zn^{++}] 0,1 mM 0,2 mM 0,4 mM	$0,59 \pm 0,03$	16
	$0,53 \pm 0,03$	24
	$0,46 \pm 0,02$	34
[Cd^{++}] 0,1 mM 1,0 mM 2,0 mM	$0,29 \pm 0,01$	58
	$0,27 \pm 0,01$	61
	$0,24 \pm 0,01$	66
[Co^{++}] 0,1 mM 1,0 mM 2,0 mM	$0,19 \pm 0,01$	73
	$0,14 \pm 0,01$	80
	$0,10 \pm 0,01$	86

La obtención de la fracción enzimática F_s así como el sistema de incubación empleado se detallan en Métodos.

Estos resultados están de acuerdo con los publicados en hígado de rata (Farmer & Hollebone, 1984), en guisante (Spano & Timko, 1991), en *Saccharomyces cerevisiae* (Correa García *et al.*, 1991) y en *Arabidopsis thaliana* (Jones & Jordan, 1994).

VI.3. Acción de distintos efectores sobre la actividad de la PBG-D de riñón de rata

Teniendo en cuenta que el ácido fólico se comporta como un activador no esencial de la PBG-D hepática (ítem R-III.4) y que la sulfamerazina (SMZ) es un inhibidor de tipo no competitivo de la misma (ítem R-III.5), se decidió estudiar la acción de estos efectores sobre la PBG-D renal.

VI.3.1 Efecto del ácido fólico y de la SMZ sobre distintas fracciones de PBG-D de riñón de rata

Empleando fracciones enzimáticas con distinto grado de purificación se estudió el efecto del ácido fólico 2,0 mM sobre la actividad de PBG-D de riñón de rata, manteniendo la concentración de sustrato saturante (66 μ M) (Figura R-VI.16).

El ácido fólico no muestra efecto alguno sobre la biosíntesis de porfirinas en ninguna de las fracciones enzimáticas empleadas. Este resultado sugiere que los distintos extractos enzimáticos no disponen de sitios de unión para que este compuesto exprese su efecto ya sea estimulante, tal como se observó en los estudios llevados a cabo con la enzima hepática (ítem R-III.4) o inhibitorio.

Teniendo en cuenta que la acción de un efector puede depender del grado de purificación del extracto empleado, se ensayó el efecto del ácido fólico 2,0 mM sobre fracciones enzimáticas más purificadas de PBG-D (Figura R-VI.17).

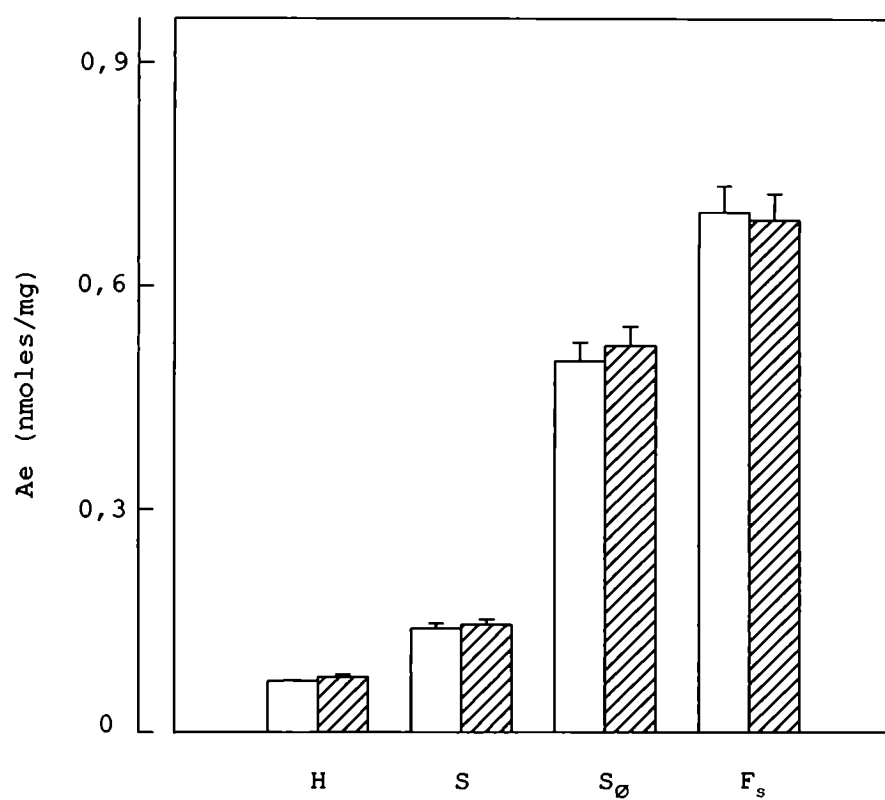


Figura R-VI.16: Efecto del ácido fólico 2,0 mM (▨) sobre distintas fracciones de PBG-D de riñón de rata. La obtención de las fracciones enzimáticas y el sistema de incubación se detallan en Métodos. Control sin ácido fólico(□).

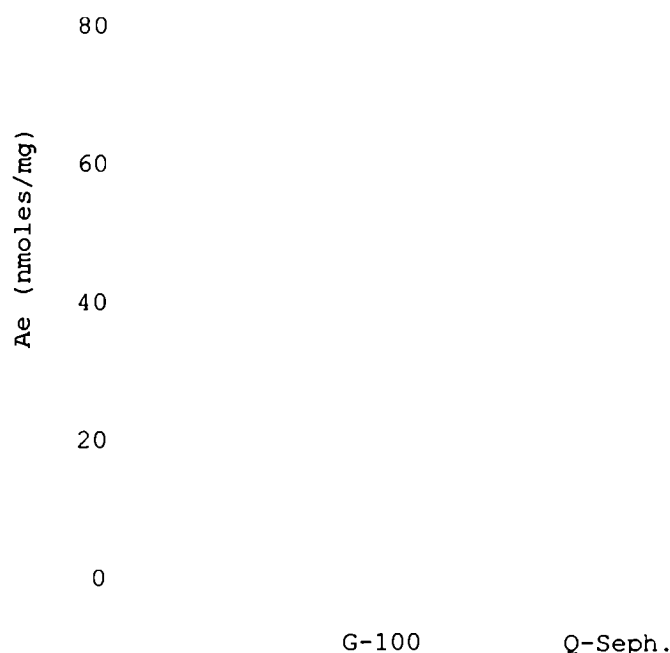


Figura R-VI.17: Efecto del ácido fólico 2,0 mM (▨) sobre las fracciones de PBG-D provenientes de Sephadex G-100 y Q-Sepharosa. La obtención de las mismas y el sistema de incubación están detallados en Métodos. Control sin ácido fólico(□).

Los resultados obtenidos indican que el ácido fólico no afecta la síntesis de porfirinas en el riñón, a diferencia de lo que habíamos observado con la enzima hepática.

Por otra parte se estudió la acción de la SMZ sobre la actividad de la PBG-D renal. Para tal fin se realizaron incubaciones de fracciones con distinto grado de purificación, en presencia de SMZ 3,0 mM y PBG saturante (66 μ M). La Tabla R-VI.8 muestra que la SMZ 3,0 mM no afecta la síntesis de porfirinas en ninguna de las fracciones ensayadas, a diferencia de lo observado en hígado (ítem R-III.5).

Tabla R-VI.8: Efecto de la SMZ sobre distintas fracciones de PBG-D de riñón de rata

Fracción	Porfirinas formadas (nmoles/mg)	
	control	[SMZ] (3,0 mM)
H	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,01
S	0,15 ± 0,02	0,14 ± 0,02
S ₀	0,50 ± 0,02	0,56 ± 0,02
F _s	0,71 ± 0,03	0,68 ± 0,03
G-100	7,30 ± 0,15	7,70 ± 0,15
Q-Septh.	83,5 ± 2,2	83,0 ± 2,1

La obtención de las distintas fracciones enzimáticas, así como el sistema de incubación empleado se detallan en Métodos.

VI.3.2 Efecto de reactivos de grupos tioles y disulfuros

Existen numerosos estudios que han demostrado la presencia de grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad de la PBG-D en diversas fuentes (Llambías & Batlle, 1971; Sancovich *et al.*, 1976; Kotler *et al.*, 1987a; Fumagalli *et al.*, 1991; Jones & Jordan, 1994) y que han establecido la participación directa de alguno de estos grupos en el mecanismo de catálisis de esta enzima (Hart *et al.*, 1988; Miller *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1988).

Para obtener información acerca de la presencia de grupos sulfhidrilos y disulfuros esenciales en la estructura de la PBG-D de riñón de rata, se estudió el comportamiento de esta enzima frente a compuestos que reaccionan específicamente con dichos grupos. Se realizaron experiencias preincubando la enzima a 37°C durante 15 minutos en ausencia de PBG. Dado que los resultados obtenidos con y sin preincubación

no difieren significativamente, se presentarán sólo los obtenidos en este último caso (Tabla R-VI.9).

Tabla R-VI.9: Efecto de reactivos protectores e inhibidores de grupos tioles y disulfuro sobre la actividad de la PBG-D

Reactivo	Porfirinas formadas (nmoles/mg)	inhibición (%)
control	0,70	0
[GSH] 2,5 mM	0,56	20
5,0 mM	0,56	20
[NEMI] 2,5 mM	0,56	20
5,0 mM	0,42	40
[PCMB] 2,5 mM	0,44	37
5,0 mM	0,17	76
[DTNB] 2,5 mM	0,32	54
5,0 mM	0,01	100
[Tiourea] 2,5 mM	0,52	25
5,0 mM	0,35	50
[NaCN] 2,5 mM	0,56	20
5,0 mM	0,32	45

La obtención de la fracción enzimática F_s , así como el sistema de incubación empleado se detallan en Métodos. Los errores en las determinaciones de las actividades no exceden el 5 - 8%.

Los reactivos protectores de grupos sulfhidrilos como la cisteína (Cis) y el DTT a concentraciones de 2,5-5,0 mM no modificaron la actividad de la PBG-D (datos no mostrados), mientras que el GSH a la misma concentración produjo una inhibición del 22% (Tabla R-VI.9).

Los agentes alquilantes p-cloromercuribenzoato (PCMB) y N-etilmaleimida (NEMI), que forman uniones de tipo mercaptida con los grupos sulfhidrilos, inhiben la formación de uroporfirina I en distinto grado: 76% y 40 % respectivamente a la mayor concentración ensayada (Tabla R-VI.9). En cambio, la iodoacetamida (2,5-5,0 mM) no afecta la actividad de la enzima renal (datos no mostrados).

El ácido 2,2'dinitro-5,5'ditiobenzoico (DTNB), agente oxidante de grupos tioles, se comporta como un potente inhibidor de la formación de uroporfirina I, mientras que los reactivos que reaccionan con uniones disulfuro (cianuro de potasio y tiourea) producen una inhibición en la formación de producto de un 45%-50% a la mayor concentración ensayada (Tabla R-VI.9).

Estos resultados indican que en la PBG-D de riñón de rata existen grupos sulfhidrilos esenciales, que no requieren la presencia de reactivos protectores para que la enzima manifieste su máxima actividad, sugiriendo que deben encontrarse en regiones no expuestas de la proteína.

CAPITULO VII

Efecto del pH sobre la cinética de la reacción de la PBG Deaminasa de riñón de rata

	Página
VII.1. Introducción.....	222
VII.2. Efecto del pH sobre la cinética de la reacción.....	222
VII.3. El protón como efector de la PBG-D de riñón de rata.....	226
VII.4. Cálculo de las constantes de ionización.....	230

VII. EFECTO DEL pH SOBRE LA CINETICA DE LA REACCION DE LA PBG-D DE RIÑON DE RATA

VII.1. Introducción

Los sitios activos de las enzimas contienen grupos ionizables que deben encontrarse en la forma iónica adecuada para mantener la conformación, poder unir sustratos y catalizar la correspondiente reacción. Paralelamente, las moléculas de sustrato también pueden poseer grupos ionizables y tan sólo una única forma iónica puede ser la que se una a la enzima para que tenga lugar la catálisis.

El estudio del efecto del pH sobre las velocidades iniciales de la reacción permite ampliar la información acerca del mecanismo cinético que obedece la enzima, dado que se pueden calcular las constantes de ionización de los grupos aminoácidos presentes en el sitio activo e involucrados en la reacción.

En este capítulo analizaremos el efecto del H^+ sobre las velocidades iniciales y las constantes cinéticas de la reacción catalizada por la PBG-D de riñón de rata.

VII.2. Efecto del pH sobre la cinética de la reacción

Se realizaron estudios de velocidades iniciales incubando 1 mg de la proteína correspondiente a la fracción F_5 a distintos tiempos (0-20 min.), en presencia de diferentes concentraciones de PBG (0-66 μ M) y buffer Tris-HCl 0,05 M a distintos pH's (6,5-9,8). Se graficaron las velocidades iniciales vs la concentración de sustrato y las correspondientes inversas de Lineweaver-Burk (Figuras R-VII.1-2) para cada pH ensayado.

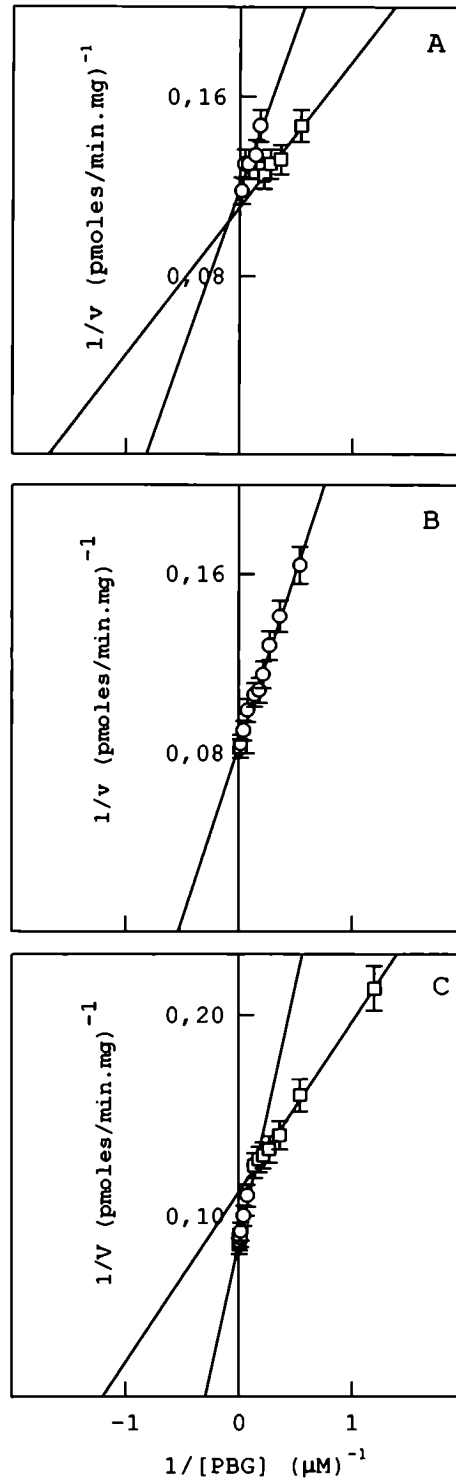


Figura R-VII.1: Gráfico de doubles recíprocas a pH's 6,5 (A); 7,4 (B) (r : 0,995) y 8,2 (C). La fracción enzimática F_s se obtuvo en buffer Tris-HCl 50 mM a los pH's antes mencionados de acuerdo con lo descrito en Métodos.

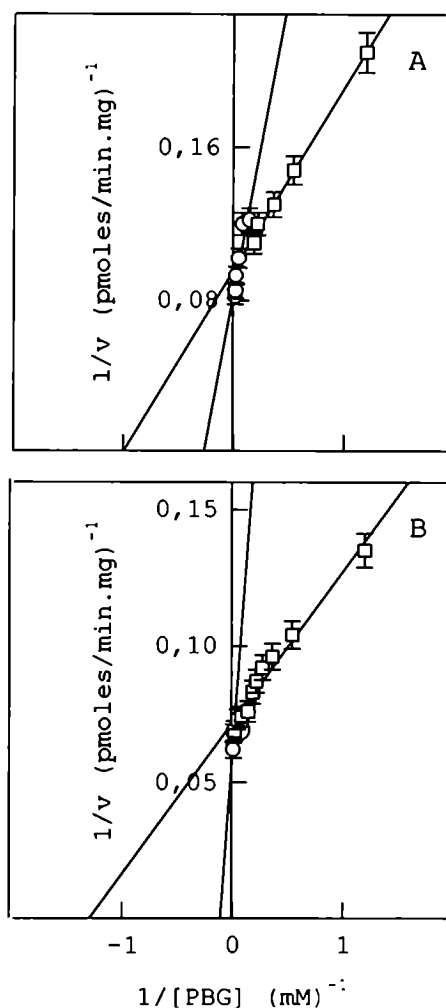


Figura R-VII.2: Gráfico de dobles recíprocas a pH's 6,8 (A) y 7,6 (B). La fracción enzimática F_s se obtuvo en buffer Tris-HCl 50 mM a los pH's antes mencionados de acuerdo con lo descrito en Métodos.

Analizando las inversas de Lineweaver-Burk se observa nuevamente, como en el caso del sodio (ítems R-IV.2 y R-VI.2.1), una sola pendiente a pH 7,4 y dos pendientes a los pH's restantes. Estas representaciones revelan el carácter bifásico de las respectivas curvas de saturación, excepto a pH 7,4 donde la enzima se ajusta a un modelo michaeliano con un coeficiente de Hill igual a 1 y con un único valor de K_m ($1,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$) y una única velocidad máxima ($12,2 \pm 0,2 \text{ pmoles/min.mg}$). Las constantes cinéticas correspondientes a estas inversas se encuentran en la Tabla R-VII.1.

Tabla R-VII.1: Efecto del pH sobre las constantes cinéticas de la PBG-D de riñón

pH	PBG (μ M)	Km (μ M)	Vm (pmoles/min.mg)	Coefficiente de Hill
6,5	0,8 - 4,7	$0,6 \pm 0,1$	$9,1 \pm 0,3$	1
	4,7 - 66	$1,2 \pm 0,1$	$8,5 \pm 0,2$	1
6,8	0,8 - 5,6	$1,0 \pm 0,1$	$10,4 \pm 0,3$	1
	5,6 - 66	$3,9 \pm 0,3$	$11,9 \pm 0,3$	1
7,4	0,8 - 66	$1,4 \pm 0,2$	$12,2 \pm 0,2$	1
7,6	0,8 - 22	$0,8 \pm 0,1$	$13,7 \pm 0,2$	1
	22 - 66	$3,5 \pm 0,3$	$15,6 \pm 0,3$	1
8,2	0,8 - 7,0	$0,8 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,2$	1
	7,0 - 66	$3,2 \pm 0,3$	$11,6 \pm 0,3$	1
9,8	0,8 - 4,7	$0,13 \pm 0,01$	$1,5 \pm 0,2$	1
	4,7 - 66	$1,9 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$	1

Las constantes tabuladas se calcularon a partir de las Figuras R-VII.1-2.

Nuevamente estamos ante la presencia de un desplazamiento del punto de inflexión, como ya fuera observado con los iones sodio (ítem R-VI.2.1) y amonio (ítem R-VI.2.4).

VII.3. El protón como efector de la PBG-D de riñón de rata

Las Figuras R-VII.3-4 muestran el efecto del H^+ sobre la cinética de la reacción considerando el mayor rango de concentración de PBG, para cada pH en particular.

El protón se comporta como un inhibidor de tipo no competitivo al analizar los pH's 6,5, 6,8 y 7,6 (Figuras R-VII.3), indicando que puede unirse tanto a la enzima libre como a los complejos ES. Este efecto inhibitorio también se observa al comparar los resultados entre los pH's 7,4 y 7,6, mientras que entre los pH's 7,6 y 9,8 el protón actúa como un activador (Figura R-VII.4). Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis desarrollada por Tipton & Dixon (1979), según la cual el efecto inhibitorio al aumentar la concentración de protones se debe a la formación de las especies no reactivas EH_2 y EH_2S , mientras que para el caso activante predominan las especies activas EH^+ y EHS^- .

Conviene aclarar que en el rango de pH's en estudio, no hay posibilidades de que la ionización del sustrato PBG se detecte, dado que los pK 's determinados para sus grupos $-COOH$ son 3,70 y 4,96.

Regraficando las pendientes y las ordenadas al origen de las Figuras R-VII.3-4, donde el protón actúa como inhibidor, en función de la concentración de los mismos (Figura R-VII.5) se establece que la inhibición es de tipo lineal. Las constantes que afectan la intersección (K_{ii}) y la pendiente (K_{ip}) tienen el mismo valor: $0,54 \pm 0,06 \mu M$.

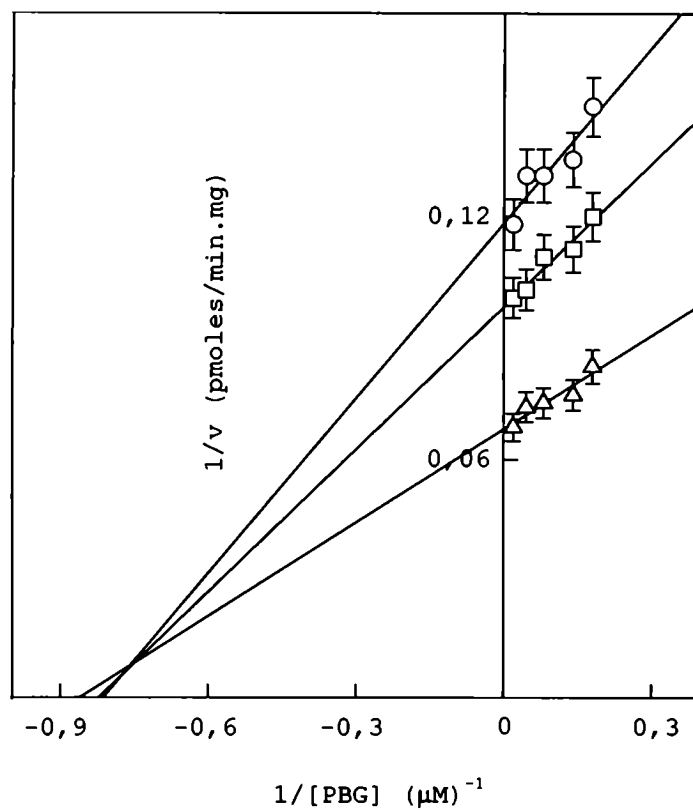


Figura R-VII.3: El H^+ como efector. Se regraficaron las inversas de las velocidades iniciales obtenidas al variar la concentración de PBG en su mayor rango, a pH's 6,5 (O; r: 0,923); 6,8 (□; r: 0,970) y 7,6 (Δ; r: 0,943). La obtención de la fracción enzimática F_s y las condiciones de medición de las velocidades iniciales se encuentran detallados en Métodos.

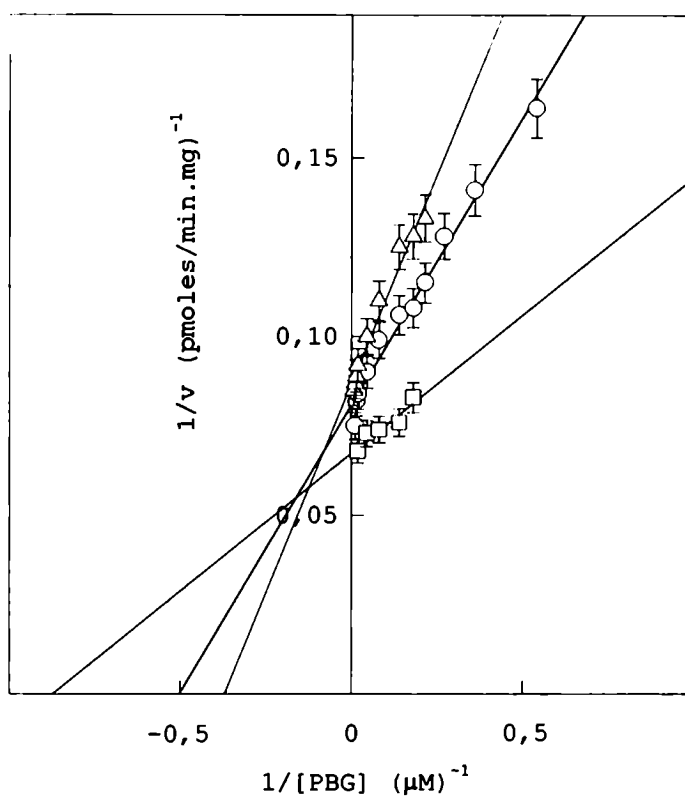


Figura R-VII.4: El H^+ como efector. Se regraficaron las inversas de las velocidades iniciales obtenidas al variar la concentración de PBG en su mayor rango, a pH's 7,4 (O; $r: 0,990$); 7,6 ($\square$; $r: 0,943$) y 8,2 (Δ ; $r: 0,983$). La obtención de la fracción enzimática F_s y las condiciones de medición de las velocidades iniciales se encuentran detallados en Métodos.

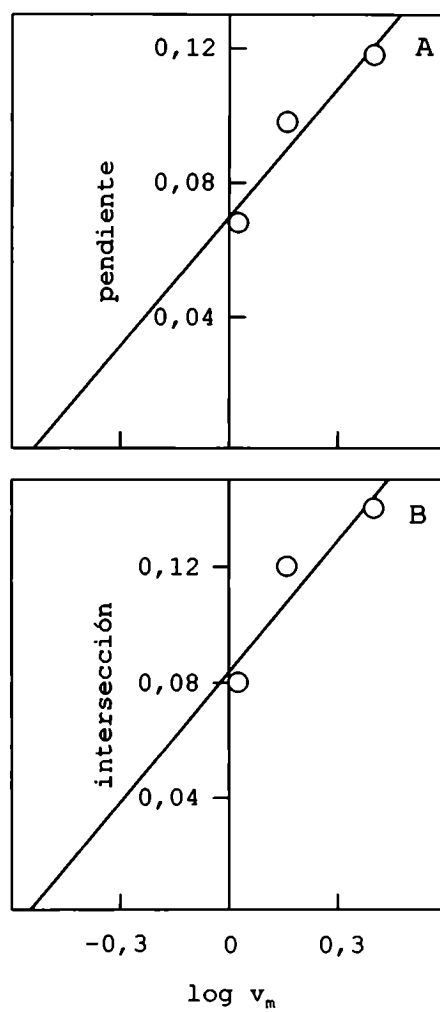


Figura R-VII.5: Se regraficaron las pendientes (A) ($r: 0,939$) y las intersecciones (B) ($r: 0,962$) de la Figura R-VII.3-4 en función de la concentración de protones.

VII.4. Cálculo de las constantes de ionización

Con el objeto de identificar aminoácidos específicos que puedan estar involucrados en la reacción de la PBG-D, se calcularon las constantes de ionización a partir de los gráficos de log de las constantes cinéticas vs pH.

Uno de los gráficos más empleados para calcular las constantes relacionadas con los complejos ES, es el de $\log V_m$ vs pH (Figura R-VII.6). A partir del mismo se obtuvo un solo valor de pK^{ES} de 7,6, el cual es coincidente para altas y bajas concentraciones de sustrato.

Por otro lado el gráfico de $\log K_m$ vs pH nos permite conocer tanto las constantes dependientes de la enzima libre como las de los complejos ES (Figura R-VII.7). A pesar de los pocos datos graficados se vislumbran cambios de pendiente a pH's 6,8 y 8,2, tanto a altas como a bajas concentraciones de sustrato.

Se debe recordar que los valores de los pK 's dependen de la temperatura, de la fuerza iónica y del microentorno del grupo ionizable. Así, un ambiente hidrofóbico estabiliza las formas no ionizadas de los grupos y la proximidad de otros grupos cargados afecta el valor de esta constante. En base a estas consideraciones y nuestros valores de pK 's, los aminoácidos más probables que podrían estar involucrados en la actividad de la PBG-D de riñón de rata serían la cisteína y la histidina, cuyos pK son de 8,33 y 6,5 medidos a 25°C en H_2O (Bohinsky, 1978).

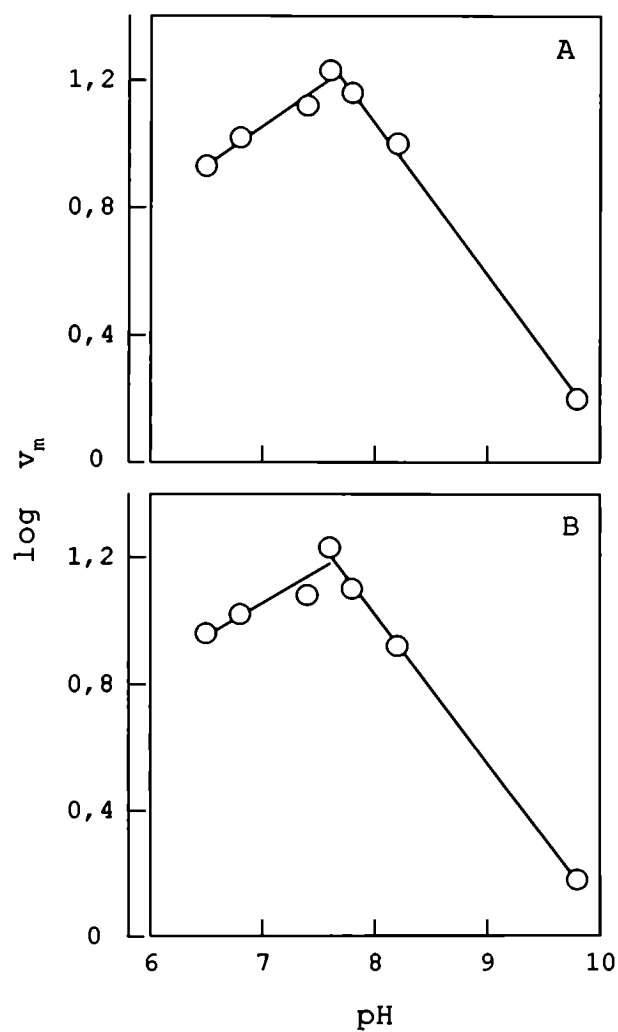


Figura R-VII.6: Gráfico de $\log V_m$ en función del pH. Se calcularon las V_m de los gráficos de las inversas a distintos pH's (6,5-9,8), a altas (A) y bajas (B) concentraciones de PBG según los rangos establecidos en la Tabla R-VII.1.

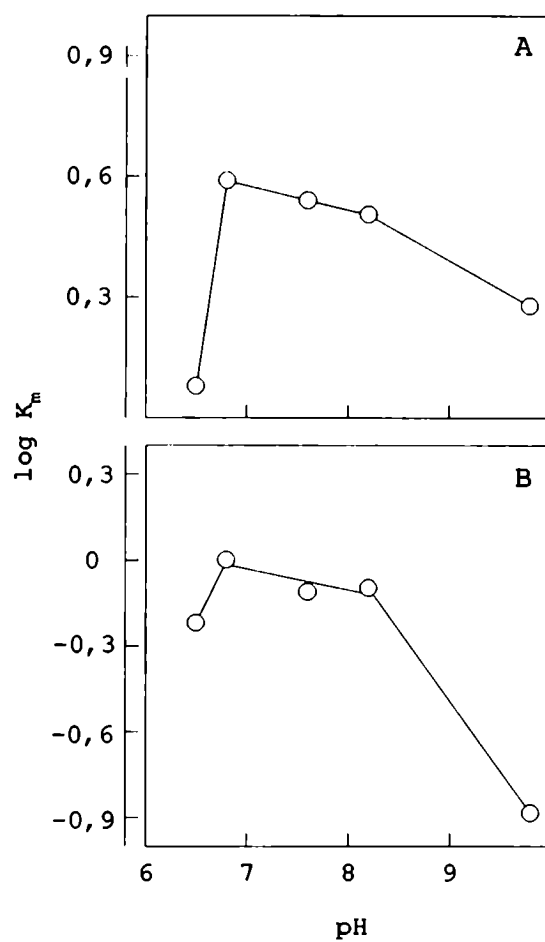


Figura R-VII.7: Dependencia de $\log K_m$ con el pH. Se determinó el K_m de la PBG-D de riñón de rata a distintos pH's (6,5 - 9,8) para altas (A) y bajas concentraciones de PBG (B), según el rango descrito en la Tabla R-VII.1.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografia

- Ainslie, G.R. & Neet, K.E. (1979) Cooperativity and the slow isomerization of δ -chymotrypsin. *Mol. Cell. Biochem.* **24**: 183-191.
- Ainslie, G.R., Shill, J.P. & Neet, K.E. (1972) Transients and cooperativity. A slow transition model for relating transients and cooperative kinetics of enzymes. *J. Biol. Chem.* **247**: 7088-7096.
- Anderson, P.M. & Desnick, R.J. (1980) Purification and properties of uroporphyrinogen I synthase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **255**: 1993-1999.
- Araujo, L.S., Lombardo, M.E., Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1987) *Saccharomyces cerevisiae*. Actividad de PBG-asa en una cepa salvaje y su mutante hemo-deficiente. *Rev. Arg. Microbiol.* **19**: 109-120.
- Araujo, L.S., Lombardo, M.E., Rossetti, M.V. & Batlle, A. M. C. (1989) *Saccharomyces cerevisiae* porphobilinogenase: some physical and kinetic properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **92 B**: 297-301.
- Bardsley, W.G. & Childs, R.E. (1975) Sigmoid curves, non-linear double-reciprocal plots and allosterism. *Biochem. J.* **149**: 313-328.
- Batlle, A. & Rossetti, M.V. (1977) Enzymic polymerization of porphobilinogen into uroporphyrinogens. *Int. J. Biochem.* **8**: 251-267.
- Battersby, A.R., Fookes, C.J.R., Gustafson-Potter, K.E., Mc Donald, E. & Matcham, G.W.J. (1982) Biosynthesis of porphyrins and related macrocycles. Part 18. Proof by spectroscopy and synthesis that unrearranged hydroxymethylbilane is the product from deaminase and the substrate for cosynthetase in the biosynthesis of uroporphyrinogen III. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 2427-2444.
- Battersby, A.R., Fookes, C.J.R., Matcham, G.W.J. & Mc Donald, E. (1983) Biosynthesis of porphyrins and related macrocycles. Part 20. Purification of deaminase and studies on its mode of action. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 3031-3040.
- Bogorad, L. (1962) In *Methods in Enzimology*. Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. (eds), Academic Press, N. Y., vol. V, pp 885.
- Cardalda, C.A., Juknat, A.A., Princ, F.G. & Batlle, A. (1997) Rat harderian gland porphobilinogen-deaminase. Characterization studies and regulatory action of protoporphyrin IX. *Arch. Biochem. Biophys.* **347**: 69-77.

Cárdenas, M.L. & Cornish-Bowden, A. (1993) Rounding error, an unexpected fault in the output from a recording spectrophotometer: implications for model discrimination. *Biochem. J.* **292**: 37-40.

Cleland, W.W. (1963) The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products. *Biochim. Biophys. Acta* **67**: 104-137.

Cornish-Bowden, A. (1974) A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. *Biochem. J.* **137**: 143-144.

Cornish-Bowden, A. (1986) Why is uncompetitive inhibition so rare? *FEBS Lett.* **203**: 3-6.

Cornish-Bowden, A. (1995) *Analysis of enzyme kinetic data*. Oxford University Press Inc. New York.

Cornish-Bowden, A. & Cardenas, M.L. (1987) Cooperativity in monomeric enzymes. Mini review. *J. theor. Biol.* **124**: 1-23.

Correa García S., Rossetti M. V., Batlle A. M. C. (1991) Studies on Porphobilinogen - Deaminase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Z. Naturforsch.* **46c**: 1017-1023.

Christenson, W.R., Reddy, V.R. & Piper, W. (1986) Reversal of sulfamerazine inhibition of rat hepatic uroporphyrinogen synthesis by folic acid. *Life Sci.* **38**: 1679-1684.

Elliot, K.R. & Tipton, K.F. (1974) A kinetic analysis of enzyme systems involving four substrates. *Biochem. J.* **141**: 789-805.

Frieden, C. (1959) Glutamic dehydrogenase. The effect of various nucleotides on the association-dissociation and kinetic properties. *J. Biol. Chem.* **234**: 815-820.

Frieden, C. (1964) Treatment of enzyme kinetic data. The effect of modifiers on the kinetic parameters of single substrate enzymes. *J. Biol. Chem.* **239**: 3522-3531.

Fumagalli, S.A., Kotler, M.L., Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1985) Human red cell porphobilinogen deaminase. A simple method of purification and some unusual properties. *Int. J. Biochem.* **17**: 485-495.

Fumagalli, S.A., Kotler, M.L., Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1991) Studies on uroporphyrinogen biosynthesis in pig liver. *Z. Naturforsch.* **46c**: 1101-1108.

Ghosh, N.K. & Fishman, W.H. (1966) On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by L-phenylalanine. *J. Biol. Chem.* **241**: 2516-2522.

Hart, G.J. & Battersby, A.R. (1985) Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase from *Euglena gracilis*. *Biochem. J.* **232**: 151-160.

Hart, G.J., Miller, A.D., Leeper, F.J. & Battersby, A.R. (1988) Evidence that the pyrrromethane cofactor of the hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) is bound through a sulphur atom of a cysteine residue. *Biochem. J.* **252**: 909-912.

Hensley, P., Yang, Y.R. & Schachman, H.K. (1981) On the detection of homotropic effects in enzymes of low cooperativity. Application to modified aspartate transcarbamylase. *J. Mol. Biol.* **152**: 131-152.

Jones, R. & Jordan, P. (1994) Purification and properties of porphobilinogen deaminase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* **299**: 895 - 902.

Jordan, P.M. & Shemin, D. (1973) Purification and properties of uroporphyrinogen I synthetase from *Rhodopseudomonas spheroides*. *J. Biol. Chem.* **248**: 1019-1024.

Jordan, P.M. & Woodcock, S.C. (1991) Mutagenesis of arginine residues in the catalytic cleft of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase that affects dipyrromethane cofactor assembly and tetrapyrrole chain initiation and elongation. *Biochem. J.* **280**: 445 - 449.

Jordan, P., Thomas, D. & Warren, M. (1987) Evidence for the dipyrromethane cofactor at the catalytic site of *E. coli* porphobilinogen deaminase. *FEBS Lett.* **225**: 87-92.

Jordan, P.M., Thomas, S.D. & Warren, M.J. (1988a) Purification, crystallization and properties of porphobilinogen deaminase from a recombinant strain of *Escherichia coli* K12. *Biochem. J.* **254**: 427-435.

Jordan, P.M., Warren, M.J., Williams, H.J., Stolowich, N.J., Roessner, C.A., Grant, S.K. & Scott, A.Y. (1988b) Identification of a cysteine residue as the binding site for the dipyrromethane cofactor at the active site of *Escherichia coli* porphobilinogen deaminase. *FEBS Lett.* **235**: 189 - 193.

Juknat, A.A. (1983) *Biosíntesis enzimática de porfirinógenos*. Tesis Doctoral. FCEN - UBA.

Juknat, A.A., Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1981) Porphyrin biosynthesis in *Euglena gracilis* IV. An endogenous factor controlling the enzyme synthesis of porphobilinogen and its possible role in the treatment of some porphyrias. *Int. J. Biochem.* **13**: 343-352.

Juknat, A.A., Dörnemann, D. & Senger, H. (1988a) Biosynthesis of porphyrinogens in etiolated *Euglena gracilis* Z. I.- Isolation and purification of an endogenous factor stimulating the formation of porphyrinogens. *Z. Naturforsch.* **43 c**: 351-356.

Juknat, A.A., Dörnemann, D. & Senger, H. (1988b) Biosynthesis of porphyrinogens in etiolated *Euglena gracilis* Z. II. Identification of a regulatory pteridine. *Z. Naturforsch.* **43c**: 357-362.

Juknat, A.A., Kotler, M. L., Koopmann, G. E. & Batlle, A. (1989) Porphobilinogenase from *Rhodopseudomonas palustris*. *Comp. Biochem. Physiol.* **92 B** : 291-295.

Juknat, A.A., Dörnemann, D. & Senger, H. (1994) Purification and kinetic studies on a porphobilinogen deaminase from the unicellular green alga *Scenedesmus obliquus*. *Planta* **193**: 123-130.

Kohashi, M., Clement, R.P., Tse, J. & Piper, W.N. (1984) Rat hepatic uroporphyrinogen III cosynthase. *Biochem. J.* **220**: 755-765.

Koshland, D.E., Jr., Némethy, G. & Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in protein containing subunits. *Biochemistry* **5**: 365-385.

Kotler, M.L., Fumagalli, S.A., Juknat, A.A. & Batlle, A. (1987a) Porphyrin biosynthesis in *Rhodopseudomonas palustris*. VIII. Purification and properties of deaminase. *Comp. Biochem. Physiol.* **87 B**: 601 - 606.

Kotler, M.L., Fumagalli, S.A., Juknat, A.A. & Batlle, A. (1987b) Porphyrin biosynthesis in *Rhodopseudomonas palustris* - IX. PBG - deaminase. Kinetic studies. *Int. J. Biochem.* **19**: 981 - 985.

Kotler, M.L., Juknat, A.A., Correa García, S.R. & Batlle, A. (1988a) The action of sulphamerazine of porphyrin biosynthesis in rats. *Med. Sci. Res.* **16**: 323 - 324.

Kotler, M.L., Juknat, A.A., Correa Garcia, S.R., Princ, F.G. & Batlle, A. (1988b) *In vitro* sulphamerazine inhibition of rat blood uroporphyrinogen I synthetase and its reversal by folic acid. *Med. Sci. Res.* **16**: 983-984.

Kotler, M.L., Juknat, A.A. & Batlle, A. (1990) Immobilized uroporphyrinogen I synthetase from *Rhodopseudomonas palustris*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **12**: 252 - 257.

Kotler, M.L., Juknat, A.A., Fumagalli, S.A. & Batlle, A. (1991) Involvement of free and enzyme - bound intermediates in the reaction mechanism catalyzed by the bovine liver immobilized porphobilinogen - deaminase. Proof that they are substrates for cosynthetase in uroporphyrinogen III biosynthesis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **13**: 173 - 180.

Llambías, E.B.C. & Batlle, A. (1970a) Negative homotropic kinetics of soybean callus porphobilinogen - uroporphyrinogen III cosynthetase. *FEBS Lett.* **9**: 180 - 182.

Llambías, E.B.C. & Batlle, A. (1970b) Evidence for the existence of a polypyrrolic substrate of uroporphyrinogen III cosynthetase. *FEBS Lett.* **6**: 285 - 288.

Llambías, E.B.C. & Batlle, A. (1971a) Studies on porphobilinogen deaminase-uroporphyrinogen III cosynthetase system of cultured soybean cells. *Biochem. J.* **121**: 327-340.

Llambías, E.B.C. & Batlle, A. (1971b) Porphyrin biosynthesis. VIII. Avian erythrocyte PBG deaminase - urogen III cosynthetase; its purification, properties and separation of its components. *Biochem. Biophys. Acta* **227**: 180 - 191.

Makarchikov, A. F. & Chernikevich, I. P. (1992) Purification and characterization of thiamine triphosphatase from bovine brain. *Biochem. Biophys. Acta*, **1117**: 326-332.

Mazzetti, M. & Tomio, J.M. (1988) Characterization of porphobilinogen-deaminase from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **957**: 97-104.

Meissner, P., Adams, P. & Kirsch, R. (1993) Allosteric inhibition of human lymphoblast and purified porphobilinogen deaminase by protoporphyrinogen and coproporphyrinogen. *J. Clin. Invest.* **91**: 1436-1444.

Meunier, J.-C., Buc, J., Navarro, A. & Ricard, J. (1974) Regulatory behavior of monomeric enzymes. 2. A wheat-germ hexokinase as a mnemonical enzyme. *Eur. J. Biochem.* **49**: 209-223.

Miller, A.D., Hart, G.J., Packman, L.C. & Battersby, A.R. (1988) Evidence that the pyrromethane cofactor of hydroxymethylbilane synthase is bound to the protein through the sulphur atom of cysteine-242. *Biochem. J.* **254**: 915-918.

Miyagi, K., Kaneshima, M., Kawakami, J., Nakada, F., Petryka, Z.J. & Watson, C.J. (1979) Uroporphyrinogen I synthase from human erythrocytes: separation, purification and properties of isoenzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 6172-6176.

Monod, J., Changeux, J.-P. & Jacob, F. (1963) *J. Mol. Biol.* **6**: 306-329.

Noriega, G.O., Juknat, A.A. & Batlle, A. (1992) Non-essential activation of rat liver porphobilinogen-deaminase by folic acid. *Z. Naturforsch.* **47c**: 416-419.

Palma, M.S., Teno, A.M. & Rossi, A. (1983) Acid phosphatase from maize scutellum: negative cooperativity suppression by glucose. *Phytochemistry* **22**: 1899-1901.

Peters, P.G., Sharma, M., Hardwick, D. & Piper, W.N. (1980). Sulfonamide inhibition of rat hepatic uroporphyrinogen I synthetase activity and biosynthesis of heme. *Arch. Biochem. Biophys.* **201**: 88-94.

Piper, W.N. & van Lier, R.B.L. (1977) Pteridine regulation of inhibition of hepatic uroporphyrinogen I synthetase by lead chloride. *Mol. Pharmacol.* **13**: 1126 - 1135.

Radi, R., Tan, S., Prodanov, E., Evans, R. & Parks, D. (1992). Inhibition of xanthine oxidase by uric acid and its influence on superoxide radical productions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1122**: 178-182.

Ricard, J., Meunier, J.-P. & Buc, J. (1974) Regulatory behavior of monomeric enzymes. 1. The mnemonical enzyme concept. *Eur. J. Biochem.* **49**: 195-208.

Riggetti, P. (1980) Isoelectring focusing: Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals.

Rossetti, M.V. & Batlle, A. (1977) Polypyrrole intermediates in porphyrin biosynthesis. Studies with *Euglena gracilis*. *Int. J. Biochem.* **8**: 277-283.

Rossetti, M.V., Juknat, A.A. & Batlle, A. (1977) Porphyrin biosynthesis in *Euglena gracilis*. II. Pyrrolymethane intermediates in the enzymic cyclotetramerization of porphobilinogen. *Int. J. Biochem.* **8**: 781-787.

Rossetti, M.V., Juknat, A.A., Kotler, M.L., Fumagalli, S.A. & Batlle, A. (1980) Occurrence of multiple molecular forms of porphobilinogenase in diverse organism: The minimum quaternary structure of porphobilinogenase is a promoter of one deaminase and one isomerase domain. *Int. J. Biochem.* **12**: 761 - 767.

Rossetti, M.V., Lombardo, M.E., Juknat, A.A. & Batlle, A. (1986) Porphyrin biosynthesis in *Euglena gracilis* - V. Soluble and particulate PBG-ase. *Comp. Biochem. Physiol.* **85 B**: 451-458.

Rossetti, M.V., Araujo, L.S., Lombardo, M.E., Correa García, S.R. & Batlle, A. (1987) Porphyrin biosynthesis in *Euglena gracilis*. VI. The effect of growth conditions on porphobilinogenase activities and further properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **87 B**: 593-600.

Sancovich, H.A., Batlle, A. & Grinstein, M. (1969) The porphobilinogen deaminase - uroporphyrinogen III cosynthetase system (porphobilinogenase) from bovine liver. Kinetics studies. *FEBS Lett.* **3**: 223-226.

Sancovich, H.A., Ferramola, A.M., Batlle, A. & Grinstein, M. (1970) Preparation of porphobilinogen. In *Methods in Enzimology*. Tabor H., Tabor C. W. (eds), Academic Press, N. Y., vol. **XVII A**, pp. 220-222.

Sancovich, H.A., Ferramola, A.M., Batlle, A., Kivilevich, A. & Grinstein, M. (1976) Studies on cow liver porphobilinogen deaminase. *Acta physiol. latinoam.* **26**: 379-386.

Scott, A. I., Stolowich, N. J., Williams, H. J., Gonzalez, M. D., Roessner, C. A., Grant, S. K. & Pichon, C. (1988) Concerning the catalytic site of porphobilinogen deaminase. *J. Am. Chem. Soc.* **110**: 5898-5900.

Segel, I.H. (1975) In *Enzyme Kinetics*. John Wiley & Sons, New York.

Smythe, E. & Williams, D. (1988a) A simple rapid purification scheme for hydroxymethylbilane synthase from human erythrocytes. *Biochem. J.* **251**: 237-241.

Smythe, E. & Williams, D. (1988b) Rat liver uroporphyrinogen III synthase has similar properties to the enzyme from *Euglena gracilis*, including absence of a requirement for a reversibly bound cofactor for activity. *Biochem. J.* **253**: 275-279.

Spano, A.J. & Timko, M.P. (1991) Isolation, characterization and partial amino acid sequence of a chloroplast-localized porphobilinogen-deaminase from pea. *Biochim. Biophys. Acta* **1076**: 29-36.

Stein, J.A. & Tschudy, D.P. (1970) Acute intermittent porphyria: A clinical and biochemical study of 46 patients. *Medicine* **49**: 1-16.

Tephly, T. R. (1976). Identification of a small molecular weight substance that protects uroporphyrinogen I synthetase from the inhibition by lead. In *Porphyrin in human diseases*. Report of the discussions, 128-134. Doss M. & Nawrocki P. (eds.), Freiburg.

Tipton, K.F. & Dixon, H.B.F. (1979) Effects of pH on enzymes. *Methods Enzymol.* **63**: 183-234.

Visser, T.J. (1980) Mechanism of inhibition of iodothyronine-5'-deiodinase by thioureylenes and sulfite. *Biochim. Biophys. Acta* **611**: 371-378.

Williams, D.C. (1984) Characterization of the multiple forms of hydroxymethylbilane synthase from rat spleen. *Biochem. J.* **217**: 675-683.

Williams, D.C., Morgan, G.S., Mc Donald, E. & Battersby, A.R. (1981) Purification of porphobilinogen deaminase from *Euglena gracilis* and studies of its kinetics. *Biochem. J.* **193**: 301-310.

Witty, M., Jones, R.M., Robb, M.S., Jordan, P.M.S. & Smith, A.G. (1996) Subcellular location of the tetrapyrrole synthesis enzyme porphobilinogen deaminase in higher plants: an immunological investigation. *Planta* **199**: 557-564.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

I. Porfobilinógeno-deaminasa de hígado y riñón de rata. Aislamiento, purificación y propiedades

El presente trabajo constituye el primer estudio realizado acerca de la enzima porfobilinógeno-deaminasa (PBG-D) de riñón de rata, que se analiza en forma conjunta con la PBG-D de hígado de la misma fuente.

Los ensayos iniciales comprendieron una serie de experiencias tendientes a determinar las condiciones óptimas para la extracción y medición de la actividad de la PBG-D en hígado y riñón.

La proteína se extrajo mediante la técnica de homogeneización en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2, en una relación 1:10 (g de tejido: ml de buffer), concentrándose la actividad en la fracción sobrenadante de 24000xg (S). El análisis por HPLC de las porfirinas sintetizadas por dicha fracción reveló que el hígado presenta mayor porcentaje de tipo isomérico III: uroporfirina III (44%), heptaporfirina III (32%), hexaporfirina III (4%), coproporfirina III (7%) y sólo un 13% de uroporfirina I, mientras que el riñón muestra mayor cantidad de tipo I, uroporfirina I (52%), uroporfirina III (38%) y heptaporfirina III (10%).

Con la finalidad de obtener una preparación de PBG-D libre de Isomerasa, se calentaron las fracciones S de hígado (10 min a 65°C) y de riñón (5 min a 70°C). Mientras que en riñón se inactivaron completamente las enzimas Isomerasa y URO-D, en la fracción proveniente de hígado se obtuvo uroporfirina I (64%), uroporfirina III (14%), heptaporfirina III (19%) y coproporfirina III (3%).

El sobrenadante de calentamiento (S_4) de ambas fuentes, se trató con sulfato de amonio (35-70%) y el precipitado se cromatografió a través de Sephadex G-25 (fracción F_s). A partir de esta etapa se obtuvo 100% de uroporfirina I en los incubados provenientes de hígado.

Empleando la fracción F_s , se efectuaron mediciones de la actividad enzimática en función de la cantidad de proteína, del tiempo de incubación y de la concentración de sustrato. La actividad de la PBG-D de ambas fuentes, expresada como formación de

uroporfirina 1, mostró una relación lineal con la concentración de proteína (0,12 - 1,50 mg/ml) agregada al sistema de ensayo. En cuanto al tiempo de incubación, el incremento en la formación de producto fue lineal durante todo el intervalo de tiempo analizado (0 - 150 min). La curva de saturación por sustrato reveló un comportamiento hiperbólico para ambas fuentes, alcanzándose la saturación a 66 - 70 μ M.

En base a estos datos, se adoptó como sistema óptimo para medir la actividad de la PBG-D de ambas fuentes, una incubación de 1 h a 37°C, en oscuridad, empleando 66 - 70 μ M de PBG en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,2 y 0,5 ml de fracción enzimática.

A partir de una serie de ensayos preliminares, se desarrolló un procedimiento para purificar la PBG-D de ambas fuentes, que incluyó las siguientes etapas: homogeneización, centrifugación a 24000xg, ultracentrifugación a 105000xg, calentamiento, como se acaba de detallar, fraccionamiento con sulfato de amonio (35 - 70%), diálisis o desalado mediante Sephadex G-25, filtración molecular (Sephadex G-100), intercambio iónico (Q-Sepharosa) y cromatografía de afinidad (Blue Sepharosa). Se obtuvo así una fracción de PBG-D de hígado purificada 680 veces con una actividad específica de $34,2 \pm 1,7$ nmoles uroporfirina I/mg proteína. Respecto a la PBG-D de riñón, se obtuvo una fracción purificada 710 veces con una actividad específica de 50 ± 2 nmoles uroporfirina I/mg proteína.

La actividad máxima de la PBG-D se detectó en incubaciones a 65°C, a pH's 7,8 y 8,2 con una energía de activación calculada de 16,8 kcal/mol y 19,3 kcal/mol para las enzimas hepática y renal respectivamente. Mediante cromatografía por Sephadex G-100 se determinaron las masas moleculares relativas: $41,7 \pm 4,2$ kDa para hígado y $39,8 \pm 4,0$ kDa para riñón. Fracciones de PBG-D de hígado, guardadas a -20°C, mostraron el fenómeno de activación espontánea, observándose incrementos del 70% en la actividad a los 30 días, aumentos que se mantienen hasta los 124 días. En cambio, la PBG-D renal es muy estable hasta los 36 días y pierde un poco más del 30% luego de 4 meses de estacionamiento.

II. Estudios cinéticos de la PBG-D de hígado de rata

La PBG-D de hígado de rata presenta un comportamiento michaeliano, con un K_m aparente de $12 \pm 1,4 \mu\text{M}$, una V_m de $17,0 \pm 1,4 \text{ pmoles/mg.min.}$ y un n de Hill de 1, determinados a pH 8,2. A pesar de que el mecanismo de reacción involucra 4 moléculas del mismo sustrato, se obtuvo un gráfico de Lineweaver-Burk lineal, consistente con un mecanismo de desplazamiento secuencial, en el cual la liberación de amonio constituye un paso cinético irreversible.

Se investigó el efecto de conocidos inhibidores de la PBG-D, como los iones fosfato, magnesio y amonio sobre la cinética de la reacción. Los gráficos de Hanes-Woolf indican que el fosfato diácido (0-20 mM) actúa como un inhibidor incompetitivo. Se ha propuesto que este anión podría neutralizar en parte las cargas positivas de los residuos arginina presentes en el sitio activo y necesarios para la interacción con las cadenas laterales de acetato y propionato del PBG, aumentando de esta forma la formación de los complejos ESI-ES₄I e inhibiendo la polimerización y formación del producto final.

Los estudios cinéticos realizados con el ion Mg^{++} (0-80 mM) revelaron que este catión también actúa como un inhibidor incompetitivo de la PBG-D de hígado de rata. Se ha propuesto que el magnesio podría actuar bloqueando la liberación de intermediarios tetrapirrólicos, lo cual se traduciría en una disminución en la formación total de porfirinas.

En cuanto al efecto del amonio (0-50 mM), se observó que el mismo produce una inhibición no competitiva de tipo lineal. El amonio disminuye la cantidad total de porfirinas formadas, compitiendo con el agua por el azafulveno y acumulando en el medio aminometilbilanos moderadamente estables e impidiendo la síntesis final.

Se investigó además el efecto del agregado de sulfamerazina (SMZ) y ácido fólico sobre la cinética de la reacción. La SMZ (0-2,0 mM) actúa como un inhibidor no competitivo de tipo lineal mientras que el ácido fólico 2,0 mM produce una activación del 43% respecto al control, en incubados de la fracción F_s en presencia de concentración saturante de sustrato. Es interesante hacer notar que el ácido fólico no activa la síntesis de porfirinas ni en las fracciones que poseen actividad de Isomerasa ni

en el sobrenadante de calentamiento. Al realizar los estudios cinéticos en presencia de ácido fólico (0-2,0 mM) se observó que este efector actúa como un activador no esencial de la reacción, dado que la misma puede proceder aún en su ausencia.

III. Electroforesis

A pesar de las distintas técnicas cromatográficas empleadas en la purificación de la PBG-D de riñón de rata, no se llegó a una banda proteica única en la electroforesis en geles de poliacrilamida. Paralelamente, se efectuaron corridas electroforéticas en diferentes condiciones, encontrándose la actividad enzimática concentrada en una sola banda. La purificación a homogeneidad de la PBG-D renal se logró luego de una electroforesis preparativa, que dio como resultado una sola banda proteica con actividad de PBG-D, confirmada a través de Western blots.

IV. Estudios cinéticos de la PBG-D de riñón de rata

Los gráficos de velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato revelan una cinética compleja, con una primera zona de saturación comprendida entre 5,0 y 7,0 μM y una segunda a partir de 66-70 μM . Las dobles recíprocas de Lineweaver-Burk y de Eadie son no lineales y exhiben un carácter bimodal que se traduce en dos constantes aparentes de afinidad, K_{m1} : $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ y K_{m2} : $3,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$.

La no linealidad que muestran estos gráficos puede presentarse en distintos mecanismos tales como activación por sustrato, existencia de dos sitios activos independientes con diferentes constantes cinéticas, cooperatividad negativa o presencia de distintas isoformas.

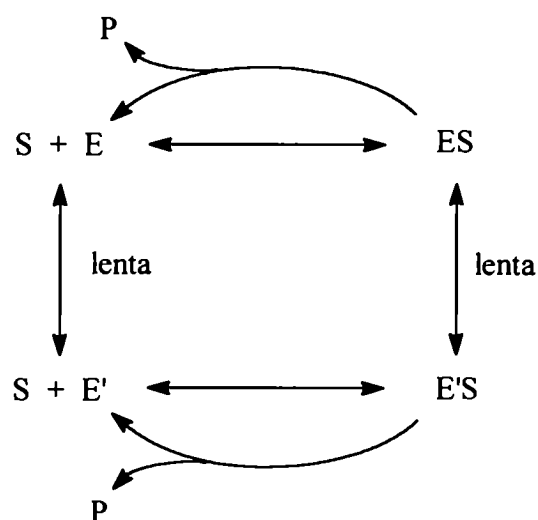
Nuestros datos no se ajustan a la ecuación de Frieden, por lo tanto podemos descartar la existencia de un mecanismo de activación por sustrato para la enzima renal.

Dado que el riñón está constituido por distintas estructuras, con diferentes propiedades anatómicas, funcionales y metabólicas, surge la posibilidad que el mismo presente isoformas de la enzima, que podrían encontrarse compartimentalizadas o juntas pero en distinta proporción. Comparando las constantes cinéticas obtenidas para el riñón

entero, con las correspondientes para médula (K_{m1} : $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$ y K_{m2} : $3,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$) y corteza (K_{m1} : $0,9 \pm 0,1 \mu\text{M}$ y K_{m2} : $5,1 \pm 0,6 \mu\text{M}$), los resultados sugieren que no existirían dos poblaciones proteicas distintas confinadas en diferentes estructuras. Además, la banda única obtenida (pI: 4,9) mediante la técnica de isoelectroenfoque, permitió descartar la presencia de isoformas de la PBG-D en riñón.

Los gráficos de dobles recíprocas no lineales, con concavidad hacia abajo son típicos de una cooperatividad negativa. Dado que la presencia de más de un sitio de unión para el sustrato es la base del concepto de cooperatividad, se la ha definido solamente para enzimas oligoméricas (Monod *et al.*, 1963; Koshland *et al.*, 1966). Sin embargo, con posterioridad, se han publicado una serie de trabajos que muestran comportamientos cinéticos de tipo cooperativo en enzimas monoméricas; como ejemplos podemos nombrar la hexoquinasa L de germen de trigo (Meunier *et al.*, 1974), la quimotripsina de páncreas (Ainslie & Neet, 1979) y la fosfatasa ácida de maíz (Palma *et al.*, 1983). Evidentemente, estos casos no pueden ser interpretados en función de interacciones entre múltiples sitios de unión ubicados en distintas subunidades, dado que son enzimas monoméricas. Más aún, es sumamente difícil explicar la presencia de una cooperatividad en enzimas monoméricas, en especial si poseen un solo sitio de unión para el sustrato. Sin embargo existen modelos cinéticos cooperativos, que no corresponden a modelos de unión de ligando en equilibrio y que tratan de explicar este comportamiento. Entre ellos se encuentran los modelos de transición lenta de Ainslie *et al.* (1972) (Esquema C.1) y el mnemónico de Ricard *et al.* (1974) (Esquema C.2). El primero de ellos establece que:

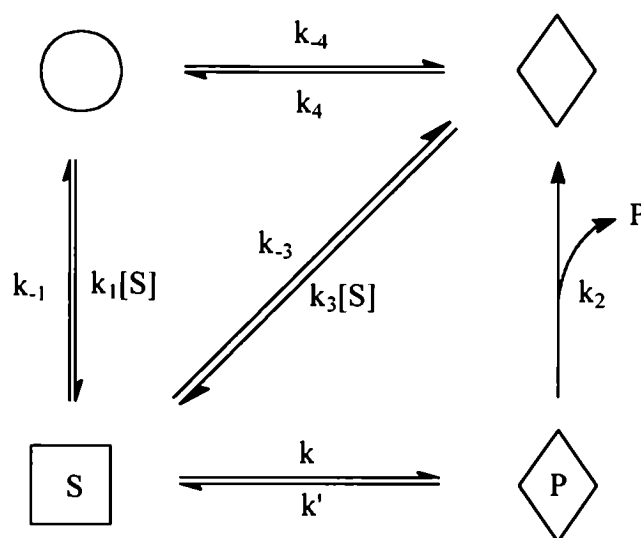
- 1) la enzima puede existir en dos o más estados conformacionales, los cuales son interconvertibles a velocidades más lentas que la correspondiente a la reacción catalítica;
- 2) cada forma enzimática es capaz de catalizar la reacción pero con constantes cinéticas diferentes;
- 3) la velocidad de interconversión y la proporción de ambos estados depende de la concentración de sustrato.



Esquema C.1: Modelo de transición lenta. S: sustrato, P: producto, E y E': estados conformacionales distintos.

Los postulados esenciales para el modelo de Ricard *et al.* (1974) establecen que:

- 1) la enzima puede existir en dos estados conformacionales interconvertibles, con una constante de equilibrio que favorece uno de los estados en ausencia del sustrato;
- 2) la forma enzimática que se libera al finalizar el ciclo catalítico es el estado más inestable pero es diferente al que predomina inicialmente;
- 3) la unión del sustrato a alguna de las dos formas enzimáticas induce un nuevo cambio conformacional necesario para la catálisis;
- 4) la velocidad con que el sustrato induce este cambio conformacional es diferente para los dos estados de la enzima libre.



Esquema C.2: Modelo de transición mnemónica. S: sustrato, P: producto. Las distintas figuras representan estados conformacionales diferentes.

De los casos de cooperatividad negativa antes mencionados, el comportamiento cinético de la quimotripsina de páncreas ha sido descripto empleando el modelo de transición lenta (Ainslie & Neet, 1979), mientras que el de la hexoquinasa de germen de trigo fue descripto como el de una enzima mnemónica (Meunier *et al.*, 1974).

Aplicando estos conceptos a la enzima monomérica PBG-D de riñón, podríamos considerar que ambos estados conformacionales serían la apoenzima y la holoenzima conteniendo el cofactor dipirrometano. Sin embargo, la etapa de conversión de la apoenzima a la holoenzima fue definida como lenta pero irreversible, dado que el cofactor se encuentra permanentemente unido (Jordan *et al.*, 1996), por lo cual podríamos descartar estos modelos de cooperatividad negativa, en los cuales uno de los postulados esenciales es la interconversión de ambos estados conformacionales.

V. Acción de distintos efectores sobre la cinética de la reacción de la PBG-D de riñón

Teniendo en cuenta el comportamiento cinético complejo y poco común que presenta la PBG-D de riñón de rata, se decidió analizar la acción de distintos efectores sobre la cinética de la reacción. Los resultados obtenidos incubando con el ion sodio (0-2,0 M) fueron sumamente interesantes. Además de inhibir la actividad de la PBG-D de riñón, el ion sodio a 0,5M produjo un desplazamiento del punto de inflexión de 7 a 15 μM mientras que a 1,0 M el punto de inflexión desaparece y los gráficos de inversas muestran una sola pendiente.

Se investigó también el efecto de los conocidos inhibidores de la PBG-D: magnesio, fosfato y amonio. En el rango de altas concentraciones de sustrato (7 - 66 μM), el ion magnesio (0-50 mM) se comporta como un inhibidor no competitivo de tipo lineal, inhibición que se transforma en incompetitiva a bajas concentraciones de sustrato (0,8 - 7,0 μM).

En cuanto al fosfato diácido (0 - 40 mM), este anión actúa como un inhibidor no competitivo de tipo lineal, a altas concentraciones de sustrato (7 - 66 μM), mientras que a bajas, el efecto es dual. La enzima manifiesta una activación máxima del 33% cuando la concentración del fosfato diácido es 25 mM y la de PBG 0,8 μM . Este efecto activante puede explicarse en términos de la existencia de algún fenómeno de cambio conformacional, originándose una nueva conformación estructural que expresa una mayor actividad. En incubaciones empleando mayores concentraciones de PBG hasta 5,0 μM y de efector entre 30 y 40 mM, se observa el efecto inhibitorio ya descripto.

Los resultados obtenidos incubando en presencia de amonio (0-300 mM) demostraron que a altas concentraciones de sustrato, el ion amonio se comporta como un inhibidor no competitivo, mientras que a bajas concentraciones, el efecto inhibitorio es más marcado cuanto mayor es la concentración de sustrato incubada. Como en el caso ya descripto del sodio, el punto de inflexión se desplaza a valores inferiores de 7 μM de PBG conforme aumenta la concentración de amonio.

En cuanto al efecto del zinc, cadmio y cobalto, los tres cationes inhibieron la formación de uroporfirina I, en distinto grado y dependiendo de su concentración, siendo el cobalto el más efectivo de los tres (86% de inhibición a 2,0 mM).

A diferencia de lo observado en hígado, ni la SMZ 3,0 mM ni el ácido fólico 2,0 mM afectan la síntesis de uroporfirina I en ninguna de las fracciones enzimáticas ensayadas.

En cuanto a los reactivos de grupos sulfhidrilos, los agentes alquilantes PCMB y NEMI ambos a 5 mM, inhiben la actividad de la PBG-D en distinto grado: 76% y 40% respectivamente. El oxidante de grupos tioles DTNB a 5 mM produce una inhibición total mientras que los reactivos que reaccionan con uniones disulfuro inhiben la actividad en un 45%-50% a la mayor concentración ensayada (5 mM). Estos resultados sugieren que existen grupos sulfhidrilos esenciales, especialmente un (los) residuo(s) cisteína, en regiones no expuestas de la proteína, por lo cual no se requiere la presencia de reactivos protectores durante la incubación.

VI. Efecto del pH

Los estudios cinéticos realizados a distintos pH's (6,5 - 9,8) e incubando con diferentes concentraciones de sustrato (0 - 66 μ M) revelaron nuevamente la presencia de una sola pendiente a pH 7,4 en los gráficos de Lineweaver-Burk y dos pendientes a los pH's restantes. Analizando el efecto del protón sobre la cinética de la reacción, se observa que el protón actúa como un activador a los pH's 7,6 y 9,8, mientras que a los pH's restantes analizados, el protón se comporta como un inhibidor de tipo no competitivo lineal. Estos estudios permitieron deducir la presencia de grupos ionizables esenciales para la unión del sustrato a la enzima y para la actividad catalítica. De estos valores, el pK de 8,2 es el más cercano al del aminoácido cisteína, confirmando los resultados anteriores.

VII. Conclusiones finales

El mecanismo propuesto para la reacción de la PBG-D involucra un solo sitio activo, donde una vez unido el sustrato, se cataliza la deaminación del PBG, la condensación del sustrato deaminado con el cofactor dipirrometano o con alguno de los complejos enzima-sustrato (ES_1 , ES_2 o ES_3) y el clivado hidrolítico final del ES_4 para formar el hidrometilbilano o preuroporfirinógeno (Warren & Jordan, 1988). En el sitio catalítico han sido definidos el sitio S para unión y deaminación del sustrato PBG y el sitio C, el cual es ocupado permanentemente por el cofactor unido y se encuentra listo para reaccionar con el sustrato deaminado translocado del sitio S (Warren & Jordan, 1988). En este caso es sumamente claro que el sitio de unión del sustrato no coincide con el sitio de liberación del producto. Nuestros resultados están de acuerdo con Louie *et al.*, (1992) quienes propusieron la existencia de una flexibilidad local en el sitio activo, necesaria para la actividad enzimática y que permite pequeños cambios conformacionales asociados con las uniones del sustrato al sitio S y del PBG deaminado al cofactor en el sitio C, con la elongación de la cadena pirrólica y la liberación del producto final.

Como conclusión del presente trabajo se propone la existencia de por lo menos dos estados conformacionales diferentes inducidos en el mismo sitio catalítico, ya sea por la unión del sustrato PBG o la no liberación del producto amonio o de ambos. La presencia de estos cambios conformacionales permitiría la continuidad en la unión de las otras moléculas de PBG al sitio S, en presencia de intermediarios ES_1 , ES_2 o ES_3 en el sitio C, lo que originaría una diferente afinidad y actividad catalítica final. Estos reordenamientos podrían producir finalmente cambios en los pasos limitantes de la reacción, lo cual sucedería a diferentes concentraciones de sustrato y daría lugar entonces a distintas constantes cinéticas.

Bibliografia

- Ainslie, G.R. & Neet, K.E. (1979) Cooperativity and the slow isomerization of δ -chymotrypsin. *Mol. Cell. Biochem.* **24**: 183-191.
- Ainslie, G.R., Shill, J.P. & Neet, K.E. (1972) Transients and cooperativity. A slow transition model for relating transients and cooperativity kinetics of enzymes. *J. Biol. Chem.* **247**: 7088-7096.
- Koshland, D.E., Jr., Némethy, G. & Filmer, D. (1966) Comparison of experimental binding data and theoretical models in protein containing subunits. *Biochemistry* **5**: 365-385.
- Jordan, P.M. Shoolingin-, Warren, M.J. & Awan, S.J. (1996) Discovery that the assembly of the dipyrromethane cofactor of PBG-D holoenzyme proceeds initially by the reaction of preuroporphyrinogen with the apoenzyme. *Biochem. J.* **316**: 373-376.
- Louie, G.V.; Brownlie, P.D.; Lambert, R.; Cooper, J.B.; Blundell, T.L.; Wood, S.P., Warren, M.J.; Woodcock, S.C. & Jordan, P.M. (1992) Structure of porphobilinogen deaminase reveals a flexible multidomain polymerase with a single catalytic site. *Nature* **359**: 33-39.
- Meunier, J.-C., Buc, J., Navarro, A. & Ricard, J. (1974) Regulatory behavior of monomeric enzymes. 2. A wheat-germ hexokinase as a mnemonical enzyme. *Eur. J. Biochem.* **49**: 209-223.
- Monod, J., Changeux, J.-P. & Jacob, F. (1963) *J. Mol. Biol.* **6**: 306-329.
- Palma, M.S., Teno, A.M. & Rossi, A. (1983) Acid phosphatase from maize scutellum: negative cooperativity suppression by glucose. *Phytochemistry* **22**: 1899-1901.
- Ricard, J., Meunier, J.-P. & Buc, J. (1974) Regulatory behavior of monomeric enzymes. 1. The mnemonical enzyme concept. *Eur. J. Biochem.* **49**: 195-208.
- Warren, M.J. & Jordan, P.M. (1988) Investigation into the nature of substrate binding to the dipyrromethane cofactor of *Escherichia coli* porphobilinogen-deaminase. *Biochemistry* **27**: 9020-9030.